

## PREMESSA

Già da molto tempo è noto che l'esposizione di animali omeotermi a basse temperature ambientali induce una risposta adattativa che consiste in una riduzione della perdita di calore ed un aumento della generazione di calore. Inizialmente la produzione di calore proviene dall'aumento di dispendio energetico che accompagna il brivido. Successivamente, questa fonte di calore è rimpiazzata da un aumento prolungato della termogenesi, che non è dovuta al brivido (*termogenesi senza brivido*) e che coinvolge una serie di cambiamenti nell'attività metabolica dell'intero organismo.

Nei roditori l'aumento della liberazione dell'ormone tiroideo è una componente importante della fase sostenuta di adattamento al freddo. In questi animali le modificazioni dell'attività metabolica in risposta al freddo si verificano in massima parte a livello del tessuto adiposo bruno, ma sono riscontrate anche in altri tessuti, tra cui il fegato e il muscolo scheletrico.

Sebbene l'ormone tiroideo svolga un ruolo essenziale nella regolazione del metabolismo e di altre funzioni dell'organismo, studi che risalgono alle ultime decadi del secolo scorso hanno dimostrato che l'aumento del livello ematico degli ormoni tiroidei, indotto nel ratto mediante trattamento con triiodotironina o tiroxina, è associato ad una alterazione dello stato redox di diversi tessuti.

Tale alterazione è stata attribuita ad una eccessiva produzione di radicali ed altre specie reattive dell'ossigeno, derivanti dalla riduzione incompleta di tale elemento. Allo sviluppo dello stress ossidativo negli animali ipertiroidei contribuisce anche una riduzione delle capacità

antiossidanti del tessuto. Comunque, ancora oggi, non è chiaro se gli effetti dannosi indotti dalla somministrazione degli ormoni tiroidei si verificano anche in condizioni in cui i livelli ematici degli ormoni tiroidei aumentano fisiologicamente come accade nell'adattamento al freddo. Nel fegato di ratto entro i primi dieci giorni di esposizione a freddo la massa delle proteine mitocondriali aumenta notevolmente. Questa modificazione è di grande rilevanza dal momento che nelle cellule la maggior parte dell'ossigeno è metabolizzato dai mitocondri che rappresentano anche la fonte principale di specie reattive dell'ossigeno.

In questo lavoro di tesi sarà esaminato, nelle linee essenziali, quanto è oggi noto sull'importanza dei radicali liberi in biologia ed in particolare sul loro coinvolgimento in alcune delle disfunzioni legate allo stato ipertiroidico.

Quindi, sarà affrontato il problema se uno stato di ipertiroidismo fisiologico, indotto mediante esposizione a basse temperature ambientali, induca nel fegato di ratto un danno ossidativo analogo a quello riscontrato nell'ipertiroidismo sperimentale. Sarà, inoltre verificato se tale danno dipenda da una aumentata produzione di radicali liberi da parte dei mitocondri. Infine, dal momento che è noto che la popolazione mitocondriale è composta da sottopopolazioni con diverse caratteristiche morfologiche e funzionali, si verificherà se l'esposizione a freddo ha effetti diversi sulle diverse sottopopolazioni.

# Introduzione

## ***Esposizione a freddo e Ormoni Tiroidei***

Una condizione di ipermetabolismo insorge, negli animali omeotermi, a seguito dell'esposizione a temperature ambientali inferiori a quelle della zona di neutralità termica.

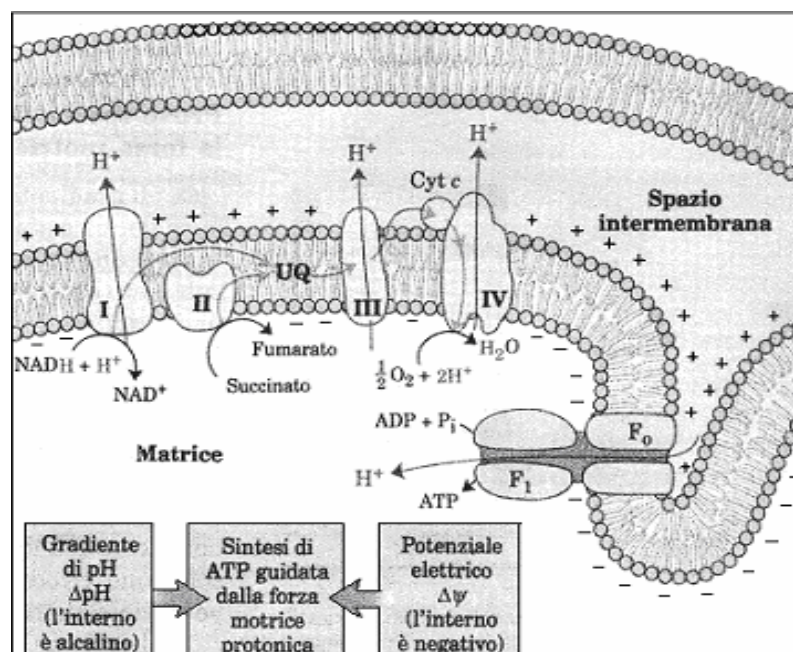
In tali condizioni, infatti, negli animali omeotermi si verificano adattamenti fisiologici necessari alla sopravvivenza alle basse temperature che consistono in un incremento del metabolismo corporeo. Tale incremento è finalizzato alla produzione di calore supplementare (termogenesi facoltativa), che compensi la perdita di calore dovuta all'aumento del gradiente termico fra la superficie corporea e dell'ambiente esterno.

Come è noto la termogenesi facoltativa è distinguibile in una termogenesi fisica o termogenesi da brivido (Shivering Thermogenesis) ed termogenesi chimica, non legata al brivido (Non shivering thermogenesis). La prima è una risposta immediata all'esposizione al freddo, che si attua mediante singole contrazioni non coordinate ed asincrone, a cui segue un'attivazione coordinata delle singole fibre muscolari che dà luogo al vero e proprio tremito.

La seconda rappresenta una risposta tardiva e sostenuta al freddo, che si attua attraverso variazioni nell'attività metabolica dell'intero organismo. In questa fase non solo aumenta l'ossidazione di zuccheri, acidi grassi ed altri substrati, ma l'energia derivante da tali reazioni è dissipata sotto forma di calore, al fine di mantenere l'omeostasi termica dell'organismo, a discapito della produzione di ATP.

Questa inefficienza metabolica intenzionale, che consiste nella mancata produzione di energia utile, viene realizzata mediante un processo di disaccoppiamento tra flusso elettronico, lungo la catena di respirazione mitocondriale, e formazione di ATP.

In condizioni normali, infatti, il trasporto mitocondriale di elettroni genera continuamente un gradiente protonico, utilizzato dall'ATP sintasi nella fosforilazione di ADP ad ATP. Viceversa, a freddo, il gradiente elettrochimico generato dal trasporto di elettroni, è disaccoppiato dalla produzione di ATP, ed è dissipato sotto forma di calore (*Figura. 1*)



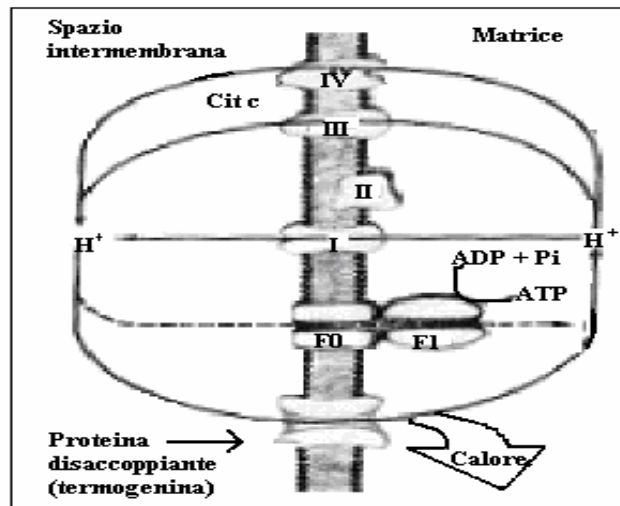
**Figura 1:** Il flusso degli elettroni è accompagnato da una traslocazione di protoni attraverso la membrana mitocondriale producendo un gradiente chimico ed elettrico. La forza motrice protonica, che spinge i protoni verso la matrice, fornisce l'energia per la sintesi di ATP, catalizzata dal complesso ATP sintetasi.

Nei mammiferi, il tessuto specializzato per il processo termogenetico è il tessuto adiposo bruno (BAT) (Himms-Hagen, 1983), un tessuto molto

vascolarizzato e ricco di mitocondri. In questi mitocondri il disaccoppiamento tra respirazione e sintesi di ATP, è mediato da una proteina della membrana mitocondriale interna, definita proteina disaccoppiante UCP<sub>1</sub> o termogenina (*Figura. 2*). Questa si comporta come un canale di controllo della permeabilità ai protoni, nella membrana mitocondriale interna (Girardier, 1983; Nicholls e Locke, 1984; Cannon e Nedergaard, 1985; Himmis-Hagen e Ricquier, 1998).

L'attività della UCP<sub>1</sub> è dipendente dalle necessità termogenetiche dell'animale ed è sottoposta al controllo del sistema nervoso simpatico e del sistema endocrino. Recenti studi hanno portato alla scoperta di altre proteine definite disaccoppianti, UCP<sub>2</sub> (Gimeno *et al.*, 1993; Fleury *et al.*, 1997), UCP<sub>3</sub> (Boss *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 1997; Vaidl-Puig *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998) e UCP<sub>4</sub> (Mao *et al.*, 1999; Sachis *et al.*, 1998), molto simili alla UCP<sub>1</sub>. Mentre la UCP<sub>1</sub> è localizzata esclusivamente nel BAT, le altre proteine disaccoppianti sono presenti in numerosi altri tessuti. La UCP<sub>2</sub> sembra essere ubiquitaria, mentre la UCP<sub>3</sub> è localizzata principalmente nel muscolo scheletrico. La UCP<sub>4</sub>, infine, si ritrova esclusivamente nel cervello.

La funzione di tali analoghi è ancora poco chiara, quindi non è noto se la loro presenza è alla base dell'aumento della produzione di calore che si verifica in altri distretti corporei, in seguito all'esposizione a freddo.



**Figura 2:** La proteina disaccoppiante (termogenina) del tessuto adiposo bruno dei mitocondri, generando una nuova via per il rientro dei protoni nella matrice mitocondriale, determina la dissipazione dell'energia conservata sotto forma di gradiente protonico in calore.

E' tuttavia, ampiamente condivisa l'idea che gli ormoni tiroidei svolgano un ruolo nella termogenesi epatica (Goglia *et al.*, 1983) e muscolare (Guernsey e Stevens, 1977) e siano, in particolare, responsabili della fase sostenuta di acclimatazione al freddo.

Il coinvolgimento degli ormoni tiroidei nel processo termogenetico è confermato dagli aumentati livelli di concentrazione dell'ormone l-triiodotironina nel siero di ratti esposti alle basse temperature ambientali, già dopo le prime 2 ore di esposizione (Nejad *et al.*, 1972). La concentrazione dell'ormone tiroideo raggiunge un picco massimo dopo due giorni di esposizione al freddo, stabilizzandosi ad un valore costante nei successivi giorni di esposizione.

Gli ormoni tiroidei sono sintetizzati e liberati dalla ghiandola tiroidea. Dal punto di vista chimico, essi sono derivati iodati

dell'aminoacido tirosina, e, più precisamente della tironina, che risulta, appunto, dall'unione di due tirosine.

Si ritiene che la  $T_3$  costituisca la forma attiva in grado di evocare la risposta dei tessuti e che gli effetti evocati dalla  $T_4$  siano dovuti alla sua conversione periferica in  $T_3$ . L'azione della  $T_3$  si esplica mediante il legame con specifici recettori nucleari, che attivano geni codificanti per enzimi legati al metabolismo cellulare.

L'effetto più evidente, esercitato in vivo dall'ormone tiroideo, è rappresentato dall'aumento del metabolismo basale dell'intero organismo e del metabolismo energetico dei tessuti in diverse specie di mammifero (Schawartz e Oppenheimer, 1987). Uno dei principali effetti degli ormoni tiroidei è quello di aumentare la respirazione mitocondriale (Roodyn *et al.*, 1965, Nishiki *et al.*, 1978) mediante numerosi e complessi cambiamenti nel numero e nell'attività dei componenti della catena di trasporto elettronico mitocondriale. L'accelerazione del trasporto elettronico mitocondriale associata alla condizione di ipermetabolismo indotta dagli ormoni tiroidei, provoca un aumento nella produzione di forme parzialmente ridotte dell'ossigeno che sono particolarmente reattive (Turrens *et al.*, 1985).



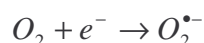
## ***Mitocondri e specie reattive dell'ossigeno***

È noto, da circa tre decenni, che il metabolismo aerobico implica la formazione di radicali e di altre specie reattive dell'ossigeno (ROS).

In genere esse si formano, in piccola quantità, proprio come sottoprodotto del normale metabolismo aerobico in diversi siti cellulari. Fonti di ROS sono, infatti, localizzate nelle membrane del reticolo endoplasmatico, nei perossisomi, nel citoplasma. Tuttavia, la fonte principale è localizzata nella catena di trasferimento elettronico mitocondriale.

Tale catena è costituita da quattro complessi proteici, attraverso i quali sono trasportati elettroni provenienti da NADH e FADH<sub>2</sub>. L'ultimo complesso della catena, l'enzima citocromo ossidasi, catalizza l'ossidazione del citocromo c con concomitante riduzione tetraivalente di O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O.

Tuttavia, trasportatori di elettroni situati nei complessi I e III, sono in grado di cedere un elettrone all'ossigeno dando origine, attraverso la sua riduzione univalente, al radicale superossido:



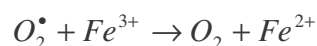
Questo, a sua volta, può essere convertito dalla superossido dismutasi, un enzima contenuto nella matrice mitocondriale, a perossido di idrogeno ed ossigeno molecolare.



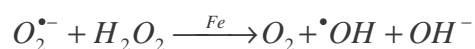
Il perossido di idrogeno, pur non essendo un radicale, dal momento che non possiede elettroni spaiati, è un agente potenzialmente pericoloso per la sua capacità di attraversare le membrane cellulari e di interagire con complessi di alcuni ioni metallici di transizione ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , *etc.*), che lo decompongono, attraverso la reazione di Fenton, nel radicale idrossilico  $\cdot\text{OH}$ , una specie estremamente più reattiva:



Lo ione ferrico può, quindi, essere ridotto dal radicale superossido a ione ferroso:



La combinazione delle due reazioni in cui  $\text{H}_2\text{O}_2$  è ridotto dal radicale superossido, in presenza di quantità catalitiche di ioni metallici, è detta reazione di Haber –Weiss:



## ***Danni ossidativi***

Le ROS possono ossidare sostanze quali DNA, proteine e lipidi (Kehrer, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1998), portando così ad una alterazione della normale funzione cellulare.

Il DNA è danneggiato, principalmente, dal radicale idrossilico che reagisce con le basi puriniche e pirimidiniche e con lo scheletro di ribosio –fosfato, provocando scissione dell'elica.

Particolarmente suscettibile alle ROS è il DNA mitocondriale, sia perché esso si trova a stretto contatto con un' importante fonte di produzione delle ROS, sia perché non è associato, come quello nucleare, a proteine istoniche che possono fungere da sistema di cattura per tali specie.

Il radicale idrossilico provoca un danno ossidativo anche alle proteine. Esso, infatti, può portare all'ossidazione delle catene laterali, alla formazione di legami proteina–proteina, all'ossidazione dello scheletro proteico. Come conseguenza possono verificarsi alterazione dell'attività enzimatica, aggregazione delle proteine o loro frammentazione, dovuta ad accelerazione della digestione proteolitica (Griffith, 1988).

Il danno alle proteine di trasporto di membrana può alterare la funzione cellulare, influenzando sulla sua omeostasi ionica. Si può, infatti, verificare un accumulo cellulare di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , capace di provocare amplificazione della lesione iniziale, attivando fosfolipasi e proteasi.

Una notevole suscettibilità al danno da ROS è evidenziata dagli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana, come l'acido arachidonico, che subiscono un processo a catena noto come perossidazione lipidica.

Questa si svolge secondo le tre fasi, tipiche delle reazioni radicaliche: induzione, propagazione e terminazione.

La prima fase è favorita da qualsiasi specie radicalica che estragga un atomo di idrogeno dalla catena alchilica di un lipide (LH).

A seguito di tale estrazione si forma un radicale che subisce una parziale stabilizzazione, trasformandosi nel radicale di un diene coniugato. Questo, a sua volta, reagisce con l'ossigeno formando il radicale perossilico (LOO<sup>•</sup>), il quale può estrarre un idrogeno da un acido grasso adiacente formando, così, un idroperossido lipidico e propagando il processo di perossidazione che ha come conseguenza la perdita di grassi polinsaturi. I perossidi lipidici possono andar incontro ad un processo di decomposizione da cui si formano alcoli, aldeidi ed idrocarburi. I prodotti aldeidici di decomposizione dei lipidi sono tossici.

Uno dei prodotti di decomposizione più noti è la malondialdeide (MDA) (Gutteridge, 1995), la cui concentrazione è stata spesso utilizzata come indicatore di danno perossidativo. L'effetto più evidente della perossidazione lipidica consiste nella diminuzione della fluidità della membrana, nell'alterazione della sua permeabilità con conseguente alterazione del trasporto ionico.

## ***Sistemi antiossidanti***

L'azione dannosa delle ROS è contrastata da un complesso sistema di difesa antiossidante (Yu, 1994), costituito da enzimi e sostanze a basso peso molecolare (free radical scavengers).

Fra gli enzimi antiossidanti sono compresi:

- la Superossido dismutasi che catalizza la conversione del superossido in acqua ossigenata;
- la Catalasi (CAT) che decompone l'acqua ossigenata in acqua ed ossigeno.
- la Glutathione perossidasi (GPX) che riduce il perossido d'idrogeno utilizzando il glutathione ridotto che viene, poi, rigenerato attraverso la glutathione reduttasi (GR) la quale si serve, a tale scopo, del NADPH prodotto nel ciclo dei pentosi-fosfati.

Fra gli antiossidanti non enzimatici che possono essere sia idrosolubili che liposolubili sono compresi:

- l' $\alpha$ -tocoferolo (Vitamina E), che previene la perossidazione lipidica iniziata dai radicali liberi ed il danno tessutale (Tappel, 1972). L' $\alpha$ -tocoferolo può donare un atomo di idrogeno fenolico ai radicali perossilici inibendo, così, l'autocatalisi della perossidazione lipidica e trasformandosi in radicale  $\alpha$ -tocoferossile, relativamente stabile;
- I carotenoidi, tra cui il  $\beta$ -carotene, uno dei più potenti scavengers dell'ossigeno singoletto nei sistemi biologici;

- l'Acido ascorbico, o vitamina C capace di ridurre lo ione ferrico a ione ferroso e di ridurre l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dando origine ad un radicale ascorbile relativamente stabile;
- Il Coenzima Q, o ubiquinone, che è un componente di tutte le membrane cellulari dei mammiferi, dove svolge una attività antiossidante che può essere ascritta ad un sinergismo con la vitamina E (Kagan *et al.*, 1990) o ad una diretta attività di scavenger (Ernster *et al.*, 1992). La sua forma ridotta, l'ubichinolo, inibisce la perossidazione lipidica grazie alla capacità di essere ossidato a semichinone e quindi ad ubiquinone, agendo così da efficiente scavenger dei radicali;
- Il Glutatione ridotto (GSH) che, oltre ad agire come cofattore della glutatione perossidasi, agisce come antiossidante. Infatti il suo gruppo tiolico può reagire con i radicali superossido ed idrossilico donando un atomo di idrogeno, neutralizzando in tal modo il radicale <sup>•</sup>OH. Inoltre il GSH mantiene in forma ridotta alcuni antiossidanti ed i gruppi sulfidrilici delle proteine (Yu, 1994), evitando la formazione di legami intra ed intermolecolari e può chelare ioni rame inibendo la genesi, indotta dallo ione, del radicale idrossile.

## ***Stress ossidativo***

In alcuni casi, la presenza di sistemi cellulari di difesa antiossidante può non essere sufficiente a ridurre la produzione o neutralizzare gli effetti delle specie reattive dell'ossigeno, per cui insorge una condizione nota come stress ossidativo (Sies, 1991).

Lo stress ossidativo è, quindi, dovuto ad uno squilibrio nel bilancio tra proossidanti ed antiossidanti in favore dei primi, e porta inevitabilmente ad un danno ossidativo. Infatti, i tessuti in cui questo squilibrio si verifica non sono più in grado di mantenere il normale rapporto GSH/GSSG ed accumulano GSSG. La conseguenza è una alterazione dello stato ossido-riduttivo intracellulare, l'inattivazione di enzimi che portano gruppi sulfidrilici nei loro siti attivi e la formazione di disolfuri misti inter- o intramolecolari.

Il fenomeno dello stress ossidativo è stato messo in relazione a numerosi stati fisiopatologici (Kehrer, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1990). Tra le condizioni che sembrano favorire l'instaurarsi di uno stress ossidativo si annoverano gli stati ipermetabolici, come la condizione di ipertiroidismo, che portano ad un aumentato flusso di ossigeno a livello cellulare.

## ***Stress ossidativo nell'ipertiroidismo***

Dati ottenuti nelle ultime due decadi hanno dimostrato che lo stato ipermetabolico indotto dall'ipertiroidismo è associato ad un incremento del danno ossidativo tissutale come documentato dall'incremento dei prodotti di perossidazione lipidica in vari tessuti (Asayama *et al.*, 1987; Fernández *et al.*, 1985; Venditti *et al.*, 1997) e dalla aumentata ossidazione delle proteine epatiche (Tapia *et al.*, 1999).

Il danno ossidativo può insorgere in seguito alla diminuzione delle capacità antiossidanti o all' incremento della produzione di radicali liberi. La determinazione dei livelli di singoli scavengers o della attività di enzimi antiossidanti in animali ipertiroidei ha fornito risultati contrastanti (Venditti *et al.*, 1997; Neradilová *et al.*, 1973; Mano *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1988). Tuttavia, recenti ricerche hanno dimostrato che le capacità antiossidanti totali, diminuiscono nel fegato di animali ipertiroidei contribuendo notevolmente al danno ossidativi (Videla, 2000).

Al danno ossidativo riscontrato nei tessuti di animali ipertiroidei contribuisce anche l'aumento della velocità di rilascio di ROS da parte dei mitocondri (Fernández e Videla, 1993; Swaroop e Ramasarma, 1985; Venditti, *et al.*, 2003; Venditti, *et al.*, 2003a,b). L'incremento del rilascio di ROS è dovuto probabilmente ad un aumento del contenuto mitocondriale di carriers elettronici auto-ossidabili.

I mitocondri rappresentano, nello stesso tempo, la principale sorgente di ROS ed il loro bersaglio primario, infatti l'aumentata produzione di ROS indotta dall'ipertiroidismo danneggia i mitocondri,



come dimostrato dall'aumento del contenuto degli indici di danno ossidativo ai lipidi ed alle proteine. Inoltre, i mitocondri isolati da tessuti animali ipertiroidei risultano anche più suscettibili agli insulti di natura ossidativa. (Venditti, *et al.*, 2003). L'aumento della suscettibilità agli insulti ossidativi potrebbe avere importanti implicazioni per la regolazione da parte degli ormoni tiroidei del turnover delle proteine mitocondriali e dell'intera popolazione mitocondriale.

## ***Eterogeneità della popolazione mitocondriale***

La popolazione mitocondriale sembra non essere omogenea, ma costituita da sottopopolazioni con diverse caratteristiche morfologiche e funzionali. Le prime prove sull'eterogeneità mitocondriale furono fornite da Kuff nel 1954 in seguito all'isolamento, dalla popolazione mitocondriale totale, di una sottopopolazione a più bassa densità, definita “*fluffy*” (soffice). Studi successivi, (Gear, 1965) condotti isolando la popolazione mitocondriale con diversi coefficienti di sedimentazione, evidenziarono la possibilità di separare i mitocondri in tre frazioni, che furono denominata pesante, leggera e fluffy.

La frazione fluffy era costituita da microsomi, mitocondri neoformati e mitocondri in fase degenerativa. Inoltre, si suppose che la frazione leggera fosse costituita da mitocondri immaturi, che rappresentavano i precursori della frazione pesante, formata da mitocondri maturi.

Negli ultimi anni lo studio delle frazioni mitocondriali ha subito un forte impulso; infatti, è stato possibile isolare da omogenati di fegato di ratto tre frazioni mitocondriali indicate come  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_{10}$  (Lanni *et al.*, 1996; Venditti *et al.*, 1996).  $M_1$  è la frazione pesante isolata a 1000g,  $M_3$  è la frazione leggera isolata a 3000g, mentre  $M_{10}$  corrisponde alla frazione fluffy ed è stata isolata a 10.000g (Gear, 1965).

La determinazione dell'attività di enzimi markers ha mostrato che la frazione  $M_1$  ed  $M_3$  sono pure, mentre la frazione  $M_{10}$  è contaminata da altri organelli cellulari quali perossisomi, lisosomi e microsomi (Lanni *et al.*, 1996). Osservazioni al microscopio elettronico hanno evidenziato che la

frazione M<sub>1</sub> contiene mitocondri più grandi rispetto alle altre due frazioni, con diametri compresi tra 0,6 e 1,6 µm. Questi mitocondri sono circa due volte più grandi dei mitocondri presenti nella frazione M<sub>3</sub>, e circa tre volte di quelli contenuti nella frazione M<sub>10</sub> (Lanni *et al.*, 1996).

Diverso è anche il contenuto proteico delle tre sottopopolazioni; infatti, l'analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide in SDS mostra che la frazione leggera è più povera di proteine ad alto peso molecolare e più ricca di quelle a basso peso molecolare (Satav *et al.*, 1973). Questo è in accordo con l'osservazione microscopica secondo cui le membrane interne di queste frazioni sono meno sviluppate di quelle esterne (Eubramamam *et al.*, 1974).

Gli studi sull'eterogeneità della popolazione mitocondriale hanno evidenziato che la differenza sostanziale tra le frazioni mitocondriali riguarda la capacità respiratoria e la capacità di contrastare insulti di natura ossidativa. La frazione M<sub>1</sub> è caratterizzata da una capacità respiratoria più elevata, da un maggiore contenuto di citocromi, ma anche da un minore livello di antiossidanti (Venditti *et al.*, 1996); a questa condizione consegue una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo. Al contrario, la frazione M<sub>10</sub> presenta caratteristiche opposte a quelle della frazione su menzionata, mentre la frazione M<sub>3</sub> evidenzia caratteristiche intermedie tra le due.

Queste osservazioni hanno indotto alcuni ricercatori a ritenere che esista un ciclo di crescita- maturazione dei mitocondri all' interno delle cellule, che parte da mitocondri di piccole dimensioni, funzionalmente meno efficienti, ma anche dotati di maggiore capacità antiossidante e

culmina in mitocondri maturi, dotati di elevata capacità respiratoria, ma anche più proni ad insulti ossidativi. La dimostrazione dell'esistenza di mitocondri leggeri, con un'attività respiratoria e un contenuto di citocromi più bassi di quelli trovati nelle altre frazioni, fornirebbe una prova all'ipotesi dell' esistenza di un ciclo di maturazione e crescita mitocondriale (Lanni *et al.*, 1996).

Quindi, i mitocondri pesanti della frazione M<sub>1</sub> avrebbero origine dai mitocondri leggeri attraverso un processo di maturazione, che conduce alla costruzione di una catena respiratoria adeguata che consente una sintesi efficiente di ATP.

Invece, i mitocondri danneggiati della frazione M<sub>10</sub> deriverebbero dalla degradazione dei mitocondri della frazione pesante, caratterizzati quindi da un elevato contenuto di citocromi ma da una bassa funzionalità. Questo suggerisce l'esistenza di un turnover proteico mitocondriale.

Non è noto il meccanismo mediante il quale sono regolate la degradazione dei mitocondri pesanti e la formazione delle strutture più leggere. Risultati ottenuti negli ultimi anni portano a ritenere che le ROS, che si formano come sottoprodotto del normale metabolismo cellulare, giochino un ruolo di primo piano nella dinamica della popolazione mitocondriale. Nell'ambito di questa ipotesi, la degradazione della frazione M<sub>1</sub> sarebbe favorita dall'aumento del contenuto di componenti della catena respiratoria.

Tale incremento, infatti, potrebbe provocare un aumento della velocità di produzione di ROS e della suscettibilità dei mitocondri agli ossidanti. Un aumento del contenuto di citocromi, infatti, è associato ad

un aumento del consumo di  $O_2$ , che determinerebbe a sua volta un incremento della velocità di produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Parte dei radicali liberi prodotti sarebbe intercettata dai sistemi scavengers, ma la riduzione dei sistemi di difesa antiossidante aumenterebbe la suscettibilità dei mitocondri allo stress ossidativo.

Questa può avere implicazioni importanti nella regolazione del turnover proteico poiché l'attacco dei radicali liberi alle proteine può portare alla loro degradazione attraverso svariati meccanismi (Stadtman, 1986; Wolff, 1986). Ciò suggerisce che la maturazione mitocondriale, legata ad un incremento dei livelli dei componenti della catena respiratoria, produce le condizioni per la degradazione mitocondriale.

# Scopo della tesi

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di verificare se l'incremento del metabolismo corporeo, che si verifica durante l'esposizione prolungata a basse temperature e che è sostenuto dall'insorgenza di uno stato di ipertiroidismo, induce nel tessuto epatico una condizione di stress ossidativo analogamente a ciò che accade nel caso di alterazioni sperimentali dello stato tiroideo.

Altro scopo del presente lavoro è stato quello di verificare la modificazione metabolica necessaria per la sopravvivenza alle basse temperature, altera le capacità antiossidanti tissutali, e la velocità di produzione mitocondriale di specie reattive dell'ossigeno.

Infine, dallo studio degli effetti del freddo su sottopopolazioni mitocondriali ottenute mediante centrifugazione differenziale, si è cercato di verificare l'esistenza di un meccanismo capace di attenuare l'insorgenza un eccessivo danno ossidativo che potrebbe verificarsi come conseguenza dell'aumento del consumo di ossigeno cellulare.

# Materiali e metodi



## ***Animali***

Per la realizzazione degli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar di 60 giorni di età. Gli animali, forniti allo svezzamento dalla ditta Nossan (Correzzana, Italia), sono stati suddivisi in tre gruppi: ratti “normali”, rappresentanti il controllo (C) esposti ad una temperatura di  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; ratti “esposti al freddo”, CE<sub>2</sub> CE<sub>10</sub>, ossia esposti ad una temperatura di  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 2 o 10 giorni rispettivamente.

I ratti di tutti i gruppi sono stati stabulati, due per gabbia, in un ambiente con un ciclo di illuminazione artificiale (12 ore di luce e 12 ore di buio) ed alimentati, ad libitum, con un alimento fornito dalla stessa Nossan. Dopo 12 ore di digiuno notturno, gli animali sono stati sottoposti alla misurazione del metabolismo basale (RMR), attraverso un sistema di calorimetria indiretta a circuito aperto (Columbus Instruments International Corp., Columbus, Ohio, USA).

## ***Procedura sperimentale***

Gli animali sono stati anestetizzati con cloralio 200mg/ml e quindi sacrificati mediante decapitazione. Campioni di sangue arterioso sono stati raccolti e successivamente analizzati per determinare i livelli plasmatici di triiodotironina totale ( $TT_3$ ) e libera ( $FT_3$ ). I fegati sono stati rapidamente rimossi e posti in piccoli beakers tenuti in ghiaccio. Successivamente il tessuto è stato finemente tagliuzzato, pesato e lavato con un mezzo di isolamento composto da mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EDTA 1 mM, tris 20 mM, a pH 7,4 e contenente BSA allo 0,1%. I frammenti di tessuto ottenuti sono stati omogeneizzati delicatamente nella stessa soluzione (1:10 p/v) mediante un omogenizzatore Potter Elvehjem ad una velocità standard (500 rpm) per 2 minuti.

## ***Isolamento dei mitocondri***

Gli omogenati sono stati sottoposti ad una centrifugazione preliminare a 500g per 10 minuti a 4°C, per ottenere la sedimentazione dei nuclei e dei frammenti tissutali. I supernatanti sono stati sottoposti ad una centrifugazione a 10.000g per 10 minuti a 4°C. I pellets sono stati lavati 2 volte in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM, a pH 7,4, ricentrifugati e risospesi in soluzione.

## **Preparazione delle frazioni mitocondriali**

Le frazioni mitocondriali sono state ottenute mediante una procedura che consente di ottenere frazioni poco contaminate da altri organelli citoplasmatici (Lanni *et al.*, 1996). L'omogenato è stato sottoposto ad una prima centrifugazione a 500 g per 10 minuti a 4°C, allo scopo di eliminare i debris cellulari ed i nuclei. Il surnatante è stato centrifugato a 10.000 g per 10 minuti a 4°C. Il pellet risultante, contenente i mitocondri, è stato risospeso due volte in una soluzione contenente mannitolo 220 mM, saccarosio 70 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM, pH 7,4 e centrifugato sempre a 10.000 g per 10 minuti a 4°C. I sedimenti sono stati risospesi nella stessa soluzione e centrifugati in successione a 1000 g, 3000 g, 10.000 g per 10 minuti a 4°C. I pellets, ottenuti in seguito a ciascuna centrifugazione, sono stati indicati rispettivamente come frazioni M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>10</sub>.

Aliquote delle frazioni mitocondriali risospese sempre nella stessa soluzione sono state utilizzate per le analisi di tipo biochimico. In accordo con precedenti studi, la determinazione preliminare di enzimi markers ha mostrato che le frazioni M<sub>1</sub> e M<sub>3</sub> erano scarsamente contaminate da altri organelli cellulari, mentre la frazione M<sub>10</sub> era contaminata da microsomi. (Venditti *et al.*, 1996, 1999).

### **Dosaggio proteico**

Il contenuto di proteine nei mitocondri totali e nelle frazioni mitocondriali è stato determinato con il metodo del biureto (Gornall *et al.*, 1949 ) dopo solubilizzazione dei campioni in deossicolato 0,5% usando albumina serica bovina ( BSA ) come standard.

## ***Attività della citocromo ossidasi***

La citocromo ossidasi (COX) è l'ultimo enzima della catena respiratoria e catalizza una reazione in cui l'ossigeno viene ridotto direttamente ad H<sub>2</sub>O. La valutazione in vitro della sua attività può essere usata come misura della massima capacità aerobica dei tessuti (Simon *et al.*, 1971) ed inoltre può fornire indicazioni sul contenuto di citocromi dei campioni in esame (Venditti *et al.*, 1996). Al fine di valutare l'attività della citocromo ossidasi dell'omogenato di fegato, campioni di omogenati (1:5) sono stati diluiti in soluzione di Chappel-Perry (ATP 1 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM) ottenendo, in tal modo, omogenati alla concentrazione di 1g/10 ml. Questi ultimi sono stati mescolati con uguali volumi di lubrol PX 10mg/ml in soluzione Chappel-Perry ed incubati per 30 minuti a 0°C per smascherare l'enzima. L'attività della COX è stata determinata polarograficamente a 30° C mediante un respirometro Gilson, fornito di un elettrodo di Clark per l'ossigeno (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA), utilizzando una modificazione (Barrè *et al.*, 1987) della procedura di Aulie e Grav (1979). Nella camera di reazione sono stati introdotti 1,5 ml di una soluzione contenente Citocromo C 30 µM, Na-Malonato 10 mM, Hepes 75 mM, Rotenone 4 µM, 2-4-Dinitrofenolo 0.5 mM cui sono stati aggiunti 20µl del campione di omogenati. Dopo la stabilizzazione dello strumento, nella camera di reazione sono stati aggiunti 15 µl di soluzione contenente Na-Ascorbato 400 mM e tetrametilparafenildiammina (TMPD) come substrato. L'attività della COX è stata espressa come µmol O/min/g di tessuto. Per determinare l'attività

della COX dei mitocondri totali e delle frazioni, sospensioni mitocondriali, a concentrazione proteica nota, sono stati inizialmente diluiti in soluzione di Chappel-Perry. Quindi ai campioni così diluiti è stato aggiunto un volume di una soluzione di lubrol (1,5 mg/ml) in soluzione di Chappel-Perry in modo da avere 0,25 mg di lubrol per mg di proteine mitocondriali. La quantità di sospensione mitocondriale da utilizzare nella determinazione è stata calcolata tenendo conto che, nella camera di reazione, dovrà essere presente una concentrazione finale di 0,2 mg/ml di proteine mitocondriali.

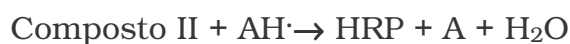
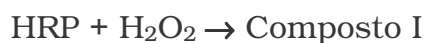
## ***Consumo di ossigeno***

La respirazione mitocondriale è stata monitorata a 30°C mediante l'utilizzo di un respirometro Gilson, dotato di elettrodo Clark per l'ossigeno. La miscela di reazione era costituita da 1,6 ml di soluzione di incubazione (KCl 145 mM, Hepes 30 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,4) contenente albumina serica bovina allo 0,1%, con 0,25 mg di proteine mitocondriali per millilitro. L'aggiunta del campione ha provocato un temporaneo decremento della concentrazione di ossigeno in soluzione dovuto al consumo dei substrati endogeni (fase1). Dopo la stabilizzazione dello strumento è stato aggiunto substrato in eccesso, in modo da provocare un costante e prolungato consumo di ossigeno (fase2).

Sono stati utilizzati come substrati succinato (10 mM), che produce equivalenti riducenti ( $\text{FADH}_2$ ) ossidati a livello del complesso II o il piruvato/malato (10/2,5 mM), che producono equivalenti riducenti (NADH), che entrano nella catena respiratoria a livello del complesso I. In seguito sono stati aggiunti al mezzo di reazione 10  $\mu\text{l}$  di ADP 20 mM con un immediato e brusco aumento del consumo di ossigeno (fase3) che declinava quando tutto l'ADP era stato consumato fino a tornare ai livelli caratteristici della fase 2 (fase4). Il rapporto del controllo della respirazione (RCR), cioè il rapporto tra il consumo di ossigeno in fase 3 e quello in fase 4, è stato calcolato con il metodo di Estabrook (1967). I risultati sono espressi come nmoli O/min/mg di proteine mitocondriali.

## ***Rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Allo scopo di valutare quantitativamente il rilascio mitocondriale di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte di enzimi citoplasmatici o di organuli cellulari (mitocondri, perossisomi, microsomi) esistono diverse tecniche analitiche che sfruttano le proprietà della perossidasi di rafano (HRP). Questo enzima catalizza l'ossidazione di numerosi substrati donatori di idrogeno (AH<sub>2</sub>) in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, secondo le reazioni :



I donatori di idrogeno utilizzati sono sostanze che diventano fluorescenti reagendo con il composto I, o che perdono la fluorescenza in seguito a tale reazione.

Sostanze dotate di tali caratteristiche sono la diacetildicloro-fluorescina, acido paraidrossifenilacetico (PHPA) ed il loro utilizzo, peraltro diffuso, consente una valutazione del rilascio mitocondriale di perossido di idrogeno.

Nei nostri esperimenti è stato utilizzato il PHPA, date le sue ottime caratteristiche funzionali. Esso in forma ridotta non è fluorescente, ma in seguito ad ossidazione catalizzata dall'HRP, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si converte nel composto stabile 2,2'-diidross-difenil-5,5'-diacetato (PHPA)<sub>2</sub> (Hyslop P.A.; Sklar L.A., 1984) che è fluorescente. La velocità di formazione di tale composto e quindi dell'aumento della fluorescenza, è



strettamente associato alla velocità di rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  da parte dei mitocondri.

Per seguire la fluorescenza generata dalla reazione di ossidazione del PHPA, è stato utilizzato un fluorimetro Jasko, dotato di una celletta termostata e collegato ad un computer. Le determinazioni sono state effettuate in cuvette di quarzo, contenenti un agitatore magnetico, alla temperatura di  $30^\circ\text{C}$ , utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 320 nm ed una di emissione di 400 nm. La miscela di reazione conteneva 0,1 mg/ml di proteine mitocondriale disciolte in un tampone respirazione (la stessa soluzione utilizzata per la misurazione del consumo di ossigeno) contenente BSA allo 0,1%, PHPA 0,2 mg/ml, HRP 60 U/ml. La reazione di produzione dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  è stata innescata dall'aggiunta di piruvato-malato (concentrazione finale 10 mM e 2,5 mM rispettivamente) o di succinato (concentrazione finale 10 mM + rotenone 4  $\mu\text{M}$ ). Circa 300 secondi dopo l'aggiunta dei substrati ossidabili, è stato aggiunto ADP 500  $\mu\text{M}$ .

I valori delle concentrazioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$  sono stati ricavati usando una curva standard di concentrazioni note di  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## ***Capacità di rimozione dell' $H_2O_2$***

La capacità di rimozione dell' $H_2O_2$  (CR) è stata determinata confrontando la capacità dei campioni mitocondriali di ridurre l'emissione di fluorescenza legata alla formazione di  $H_2O_2$  con quella di soluzioni di desferiossammina, un antiossidante, a concentrazione nota, (Venditti *et al.*, 2001). Per rimozione si intende la trasformazione dell'  $H_2O_2$ , che è operata sia da enzimi come la catalasi e la glutatione perossidasi sia da citocromi mitocondriali che convertono l' $H_2O_2$  in radicale idrossilico. Per riprodurre in vitro una condizione simile a quella delle cellule in vivo, si utilizza un sistema funzionante come sorgente continua di  $H_2O_2$ . In studi precedenti è stata utilizzata come sorgente di  $H_2O_2$ , la reazione di ossidazione del glucosio catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi (GOX), una flavoproteina altamente specifica per il  $\beta$ -D(+)-glucosio. Il substrato non fluorescente PHPA viene ossidato nel prodotto fluorescente stabile 2,2'-diidrossi-difenil-5,5'-diacetato (Hyslop e Skla; 1984), tramite la riduzione enzimatica di  $H_2O_2$  catalizzata dall'HRP. Anche in tal caso la fluorescenza è stata monitorata attraverso un fluorimetro Jasko, all'interno di cuvette di quarzo mantenute a 30°C. La reazione è stata innescata dall'aggiunta di 10  $\mu$ l GOX 80  $\mu$ g/ml ad una miscela contenente PHPA 0,2 mg/ml, HRP 6 U/ml, glucosio 5 mM in KCl 145 mM, Hepes 30 mM,  $KH_2PO_4$  5mM,  $MgCl_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, a pH 7,4. Dopo 100 secondi di incubazione, 10  $\mu$ l di desferossiamina (contenente da 1 a 12 nmol), oppure aliquote di sospensioni mitocondriali (contenenti da 0,1 a 1 mg di proteine mitocondriali) sono state aggiunte al volume finale di 2,0

ml I valori della variazione di fluorescenza per unità di tempo ( $\Delta I/\text{min}$ ), ottenuti dopo l'aggiunta di desferossiamina o di mitocondri, sono stati convertiti nella relativa percentuale dei valori ottenuti prima dell'aggiunta. I valori della desferossiamina sono stati usati per ricavare le curve standard tramite il programma Fig. P (Biosoft, Cambridge, Mass.). I valori ottenuti per le sospensioni mitocondriali sono stati, invece, utilizzati per ricavare le capacità di tali sospensioni di rimuovere l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , utilizzando l'equazione che descrive le curve standard. La capacità di rimuovere  $\text{H}_2\text{O}_2$  è stata espressa come quantità equivalente di desferiossamina per mg di proteine mitocondriali.

## ***Perossidazione lipidica***

L'estensione dei processi perossidativi a livello mitocondriale è stata determinata misurando il livello degli idroperossidi lipidici (HPs), seguendo spettrofotometricamente il consumo di NADPH in un sistema di reazioni accoppiate.

Questo metodo (Heath e Tappel, 1976) è basato su due reazioni: la prima consiste in una reazione catalizzata dall'enzima glutathione perossidasi, in cui il GSH è trasformato in GSSG:



Nella seconda reazione, il GSSG viene riconvertito a GSH dall'enzima glutathione reduttasi (GR), che sfrutta il potere riducente del NADPH, ossidandolo a NADP<sup>+</sup>:



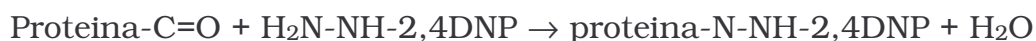
Secondo la procedura, 10 µl dei campioni, costituiti da sospensioni mitocondriali con una concentrazione di 1 mg/ml in una soluzione tampone (EDTA 0,2 mM, Tris-HCl 0,124 mM, pH 7,6) e omogenati diluiti al 10% nella stessa soluzione tampone sono mescolati con 700 µl dello stesso tampone e incubati per 5 minuti a temperatura ambiente. Per innescare la prima reazione sono stati aggiunti in rapida successione:

- 100 µl di GSH 4,25 mM
- 50 µl di NADPH 2 mM
- 10 µl di GPX 2,5 U/ml.

Le soluzioni così preparate sono state incubate a 33°C per 15 minuti. L'aggiunta dell'enzima GR alla concentrazione finale di 2,5 U/ml ha innescato l'ultima tappa del processo, in cui il NADPH viene ossidato a NADP<sup>+</sup>. Per poter valutare la quantità di NADPH consumato, sono state effettuate due letture dell'assorbanza del campione a 340 nm, al tempo zero e dopo 15 minuti. La differenza tra l'assorbimento iniziale e finale, divisa per il coefficiente di estinzione molare del NADPH ( $6,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), viene utilizzata per esprimere il contenuto mitocondriale di idroperossidi come nmoli di NADPH ossidato/min/mg di proteine mitocondriali o per g di tessuto.

## ***Danno ossidativo alle proteine***

Per la valutazione quantitativa del danno ossidativo delle proteine è stato utilizzato il metodo di Reznick e Packer (1994), modificato da Schild *et al.* (1997). Questo metodo utilizza come marker dell'ossidazione proteica i gruppi carbonilici che si formano in seguito a modificazioni ossidative indotte dai radicali su alcuni amminoacidi delle proteine. Queste reazioni sono catalizzate da cationi metallici come  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , che, legandosi a specifici siti sulle proteine e coadiuvati da  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ , possono trasformare i gruppi amminici delle catene laterali degli amminoacidi lisina, arginina, prolina ed istidina in gruppi carbonilici. La quantificazione dei gruppi carbonilici è effettuata con una metodica spettrofotometrica che consente di valutare i prodotti di reazione (idrazoni) della dinitrofenilidrazina (DNPH) con i gruppi carbonilici delle proteine:



Per ogni determinazione sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenenti ciascuna 0,5 mg di proteine mitocondriali. Tali proteine sono state precipitate in acido tricloroacetico (TCA) al 10%, centrifugate, risospese in 300  $\mu\text{l}$  di NaOH 0,1 M ed incubate a temperatura ambiente per 5 minuti. Ad una delle due aliquote sono stati aggiunti 2 ml di HCl 2,5 M (bianco), all'altra 2 ml di DNPH 10 mM in HCl 2,5 M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 1,65 ml di TCA al 20% e i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 1,5 ml di TCA

10%, tre volte con una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v) e alla fine sono stati disciolti in 1 ml di idrocloruro di guanidina 6 M. Infine si è determinato l'assorbimento a 370 nm, che corrisponde alla lunghezza d'onda a cui si ha il massimo di assorbimento della DNPH. Per il tessuto sono state utilizzate due aliquote del campione in esame, contenenti ciascuna 0,5 ml di omogenato. Tali campioni sono stati incubati per 15 minuti a temperatura ambiente con un tampone fosfato 50 mM contenente 0,1% di digitonina, 40 µg/ml di fenilmetilsulfonil-metile (PMSF), 5 µg/ml di aprotonina, EDTA 1 mM e centrifugati a 10.000 rpm per 10 minuti; il surnatante prelevato è stato poi incubato con l'1% di streptomicina a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugato nuovamente a 10.000 rpm per 10 minuti. Successivamente ad una delle due aliquote, sono stati aggiunti 4 ml di HCl 2,5 M (bianco), all'altra 4 ml di DNPH 10 mM in HCl 2.5 M. I preparati sono stati incubati per un'ora al buio a temperatura ambiente. La reazione è stata bloccata dall'aggiunta di 5 ml di TCA al 20% ed i sedimenti, ottenuti per centrifugazione, sono stati lavati una volta con 4 ml di TCA 10%, tre volte con 4 ml di una miscela di etanolo/acetato di etile (1:1 v/v), e alla fine sono stati disciolti in 2 ml di idrocloruro di guanidina 6 M. Infine si è determinato l'assorbimento a 355 e 390 nm, che corrispondono alle lunghezze d'onda a cui si hanno i picchi di massimo assorbimento della DNPH. Il contenuto di carbonili è stato calcolato, utilizzando il coefficiente di estinzione molare degli idrazoni alifatici ( $22 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) ed è stato espresso come nmoli di carbonili/mg di proteine

## ***Determinazione dei livelli degli antiossidanti***

Il contenuto mitocondriale di coenzima Q e di vitamina E è stato valutato mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) a fase inversa. In questo tipo di cromatografia gli eluenti (fase mobile) sono pompati ad elevata pressione sulla fase stazionaria rappresentata dal supporto solido contenuto nella colonna metallica. La soluzione del campione è iniettata sulla fase mobile, attraverso una porta di iniezione. Quando il campione fluisce insieme alla fase mobile attraverso la fase stazionaria, la migrazione dei suoi componenti dipende dalle interazioni non covalenti con la fase stazionaria. Le interazioni chimiche tra la fase stazionaria ed il campione e tra questi e la fase mobile determinano il grado di migrazione e la separazione dei componenti contenuti nel campione. Nella cromatografia a fase inversa la separazione avviene sulla base della idrofilicità e lipofilità. La resina contenuta nella colonna di acciaio è costituita da sfere di silicio a cui sono legate covalentemente catene n-alchiliche. In questo modo, i composti idrofili fluiscono più rapidamente dei composti idrofobici. Questa tecnica è molto vantaggiosa perché consente di realizzare la separazione cromatografica in tempi molto brevi. Per la determinazione del CoQ è stata utilizzata una colonna cromatografica C18 Ultremex 5 delle dimensioni di 250x4.6 mm, contenente particelle del diametro di 5 µm. La fase mobile era costituita da una miscela metanolo/etanolo (3/7 v/v), contenente perclorato di sodio 20 mM e la velocità del flusso era fissata ad 1 ml/min (Lang et al., 1986). Per la valutazione del contenuto totale di coenzima Q, gli ubiquinoli (CoQH<sub>2</sub>)



sono ossidati a ubiquinoni (CoQs), utilizzando tricloruro ferrico come ossidante. L'ossidazione è stata ottenuta mescolando 0,5 ml di sospensione mitocondriale con 0,5 ml di FeCl<sub>3</sub> al 2% e 2 ml di etanolo. A tale miscela sono stati aggiunti 5 ml di esano, nel quale i composti lipofili hanno una maggiore solubilità, mescolando il tutto accuratamente. Lo strato di esano è stato recuperato e successivamente rimosso per evaporazione mediante un flusso di azoto a 40°C. Il residuo secco è stato risospeso in etanolo ed iniettato sulla colonna cromatografica. Mediante uno spettrofotometro UV 100 Spectra Series si è ottenuta una lettura a 275 nm dell'assorbimento del liquido, che fuoriusciva dalla colonna, mentre un integratore, collegato ad esso, ha fornito l'area sottostante ai picchi di assorbimento. Tali aree, mediante l'ausilio di standard esterni, hanno consentito una determinazione separata del contenuto dei coenzimi Q<sub>9</sub> e Q<sub>10</sub>. Per la determinazione della vitamina E, le sospensioni mitocondriali sono state deproteinizzate con metanolo ed estratte con n-esano. Gli estratti sono stati evaporati sotto flusso di azoto a 40°C e i residui secchi disciolti in etanolo. Per determinare il contenuto di vit E è stata seguita la procedura per HPLC di Lang et al., (1986) e la determinazione quantitativa è stata ottenuta utilizzando uno standard esterno.

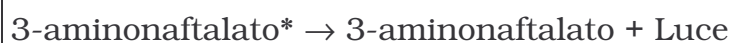
Per la determinazione del contenuto di glutathione ridotto (GSH), è stata seguita spettrofotometricamente, ad una lunghezza d'onda di 412 nm, la riduzione dell'acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) da parte del GSH. Il glutathione ossidato è ridotto dall'enzima glutathione reduttasi, in presenza di NADPH. Praticamente, per la valutazione del GSH, le

sospensioni mitocondriali e gli omogenati sono state diluite (1:1) con  $\text{HClO}_4$  0,5 N, centrifugate a 2000g per 10 minuti a 4°C (Fernandez, 1991; Ji e Fu, 1992) ed i supernatanti sono stati neutralizzati con NaOH 2M e diluiti 1:7 con fosfato di sodio 0,1 M a pH 7,4. il campione è stato diviso in due aliquote, una per il dosaggio del glutatione totale, una per la determinazione del GSSG dopo aver mascherato il GSH con vinilpiridina. Per determinare il GSH totale, sono stati prelevati 200  $\mu\text{l}$  dalle diluizioni dei campioni, cui sono stati aggiunti 600  $\mu\text{l}$  di soluzione tampone e 48  $\mu\text{l}$  di TEA (trietanolamina), procedendo alla lettura allo spettrofotometro. Per determinare il GSSG, a 120  $\mu\text{l}$  di campioni, si aggiungono 8  $\mu\text{l}$  di 2-vinilpiridina e 24  $\mu\text{l}$  di TEA, che ha la funzione di favorire l'auto-ossidazione del GSH. Si incuba per 20-60 minuti a 25°C, in modo da ottenere il completo mascheramento del GSH. La concentrazione di GSH è stata misurata come descritto da Griffith (1980). La velocità di riduzione del DTNB è sostanzialmente lineare e dipende dal solo glutatione totale (Tietze, 1969): la velocità di variazione del colore è proporzionale al contenuto del glutatione totale, che è ricavato da curve costruite con soluzioni standard di GSH e GSSG ed è espressa in nmoli di DTNB ridotto/mg di proteine mitocondriali.

## ***Suscettibilità allo stress ossidativo***

La valutazione della risposta allo stress ossidativo è stata effettuata con metodiche sviluppate nel nostro laboratorio, che prevedono l'utilizzo della strumentazione e dei reattivi dell'Amerlite system (Johnson & Johnson, Cinisello Balsamo; Italy). Tali metodiche si basano sul principio che l'interazione tra radicali liberi e composti chemiluminescenti genera un segnale luminoso potenziato con meccanismi a cascata (chemiluminescenza potenziata). Per chemiluminescenza si intende l'emissione di luce dovuta a reazioni esoergoniche, in genere ossidative. Negli ultimi anni sono stati sintetizzati molti composti chemiluminescenti. Tra questi il più conosciuto è il luminolo, un diacilidrazide ciclico che emette luce in seguito ad ossidazione. La reazione tra luminolo e perossido d'idrogeno, mostrata in figura 4 richiede un catalizzatore, di natura metallica come il rame o di natura enzimatica come una perossidasi. Nel metodo da noi utilizzato per la valutazione della risposta allo stress ossidativo è stata impiegata la perossidasi di rafano (HRP) come catalizzatore della formazione del radicale idrossilico ( $\bullet\text{OH}$ ). La reazione catalizzata dall'HRP è abbastanza complessa e consiste in una serie di reazioni che comportano la formazione dell'anione 3-aminoftalato nello stato energetico eccitato. Il decadimento di tale stato eccitato si traduce poi in una emissione luminosa (Llesuy *et al.*, 1990).

**Possibile meccanismo semplificato per la luminescenza  
potenziata dall'HRP.**



**Figura 3:** Luminescenza potenziata

Il dosaggio è stato compiuto in piastre contenenti micropozzetti. La reazione è stata innescata miscelando 25 µl di ciascuna diluizione tissutale e mitocondriale con 250 µl di una miscela di reazione (RM), preparata sciogliendo una tavoletta contenente substrato in eccesso (perborato di sodio) e sostanze che generano il segnale luminoso (benzoato di sodio, indofenolo, luminolo) in tampone a pH 8,6 forniti dalla Johnson&Johnson.

Il perborato di sodio agiva da pro-ossidante liberando in soluzione perossido d'idrogeno. Le piastre, incubate a 37°C sotto agitazione per circa 30 secondi, sono state inserite in un analizzatore automatico del segnale luminoso, che ha fornito i valori di emissione come percentuale di uno standard arbitrario, costituito da 25 µl di perossidasi a concentrazione pari a 22 ng/ml. I valori dell'emissione luminosa ottenuti sono stati impiegati per la costruzione di una curva dose-risposta, usando il programma FIG-P (Biosoft, Cambridge, UK).

## ***Potenziale elettrico transmembrana e swelling mitocondriale***

Attraverso la membrana mitocondriale interna esiste un gradiente elettrochimico protonico. Si ritiene che questo gradiente, composto dal potenziale di membrana ( $\Delta\Phi$ ) e dalla differenza di pH, sia il legame obbligatorio tra la respirazione e il processo di fosforilazione dell'ADP.

Negli esperimenti riportati in questa tesi per la misura del  $\Delta\Phi$  è stata utilizzata la safranina, un colorante carico positivamente la cui distribuzione ai due lati della membrana di mitocondri che respirano (mitocondri energizzati) è dipendente dal  $\Delta\Phi$  ed è associata ad una variazione dello spettro di assorbimento e di fluorescenza. Infatti questo colorante si muove sotto l'influenza del  $\Delta\Phi$  dallo spazio esterno a quello interno e si distribuisce all'equilibrio tra la matrice e l'esterno. All'interno della matrice le molecole di safranina possono aggregarsi a formare delle strutture dimeriche. Il passaggio dalla forma monomerica a quella dimerica è associato ad una diminuzione dell'assorbanza e ad una riduzione della fluorescenza. Negli esperimenti riportati in questo lavoro sono state registrate le variazioni della fluorescenza con un fluorimetro Jasco utilizzando come lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione 495 nm e 586 nm rispettivamente, con un angolo di apertura di 5 nm.

Il  $\Delta\Phi$  è stato determinato secondo il metodo di Åckerman e Wilkstrom (1976), utilizzando una curva di taratura ottenuta incubando i mitocondri in un mezzo contenente saccarosio 200 mM, Hepes 10 mM, rotenone 6  $\mu$ M, EDTA 0,38 mM, safranina 8  $\mu$ M, valinomicina 38,5 ng/ml

a pH 7,2 e KCl a concentrazione variabili, da 0 a 0,96 mM. Il  $\Delta\Phi$  è stato calcolato secondo l'equazione di Nerst

$$\Delta\Phi = 60 \log [K]_{\text{int}} / [K]_{\text{est}}$$

Dove la  $[K]_{\text{int}}$  è stata considerata 120 mM, mentre quella esterna è stata fornita dalla quantità di  $K^+$  aggiunta.

Le variazioni della fluorescenza della safranina, e quindi del potenziale di membrana, sono state misurate sulle sospensioni mitocondriali in seguito all'aggiunta di  $Ca^{2+}$ , per accertare il verificarsi delle variazioni di potenziale che normalmente precedono il rigonfiamento (swelling) mitocondriale associato alla transizione della permeabilità di membrana (MPT).

Questo fenomeno indotto dagli ioni calcio consiste nell'apertura, nella membrana mitocondriale interna, di pori aspecifici attraverso cui passano acqua e soluti. La dipendenza dello swelling dalla formazione dei pori di transizione di permeabilità è dimostrata dal fatto che questo fenomeno è inibito dalla ciclosporina A (CSA), un inibitore specifico della formazione dei pori di transizione (Castilho *et al.*, 1998).

Gli esperimenti per la misura della variazione di potenziale sono stati effettuati aggiungendo  $Ca^{2+}$  alla concentrazione finale 100  $\mu\text{M}$  ad una cuvetta termostata a 30 °C, contenente 0,3 mg/ml di sospensione mitocondriale in un mezzo costituito da saccarosio 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, safranina 8  $\mu\text{M}$ , succinato 2 mM e rotenone 6  $\mu\text{M}$  a pH 7,2. La variazione di fluorescenza è stata seguita per circa 100 s.

Gli esperimenti volti a determinare l'estensione dello swelling mitocondriale sono stati effettuati seguendo allo spettrofotometro le variazioni dell'assorbimento a 600 nm delle sospensioni mitocondriali, contenenti 0,3 mg di proteine per ml di un mezzo di incubazione (MI) costituito da saccarosio 125 mM, KCl 65 mM, HEPES 10 mM, succinato 2 mM, rotenone 4  $\mu$ M e  $\text{Ca}^{2+}$  100  $\mu$ M a pH 7,2. Per ciascuna sospensione mitocondriale sono stati incubati 3 campioni a cui erano aggiunti rispettivamente MI, MI contenente EGTA (concentrazione finale 1 mM) e MI contenente CSA. La variazione dell'assorbimento è stata seguita per 16 minuti.



## ***Analisi statistica***

I risultati ottenuti in otto differenti esperimenti, sono stati espressi come valori medi  $\pm$  l'errore standard. I dati sono stati analizzati con il metodo della varianza ad una via oppure a due vie quando opportuno. Quando è stato trovato un valore del rapporto F significativo, è stato usato il test di Student-Newman-Keul per determinare la significatività statistica delle differenze tra le medie. I valori sono stati considerati significativamente differenti quando  $P < 0,05$ .

# Risultati

## ***Determinazione dello stato tiroideo***

Lo stato tiroideo è stato valutato prendendo in considerazione i seguenti parametri:

- 1) il rapporto peso cuore/peso corpo;
- 2) il metabolismo basale;
- 3) i livelli plasmatici di TT<sub>3</sub> ed FT<sub>3</sub>. (*Tabella 1*)

Mentre il peso del corpo non è influenzato significativamente dall'esposizione al freddo, il peso del cuore aumenta. Di conseguenza, i ratti esposti alle basse temperature, esibiscono un rapporto peso cuore/peso corpo più elevato rispetto agli animali di controllo, inoltre tale rapporto risulta maggiore nei ratti esposti per dieci giorni rispetto a quelli esposti per due giorni. Anche il metabolismo basale ed i livelli ematici di TT<sub>3</sub> ed FT<sub>3</sub>, aumentano in maniera significativa già dopo 2 giorni di esposizione al freddo.

**Tabella 1****Valutazione dello stato tiroideo dei ratti.**

<i>PARAMETRI</i>	<i>ANIMALI</i>		
	<b>C</b>	<b>CE<sub>2</sub></b>	<b>CE<sub>10</sub></b>
<b>P<sub>cuore</sub> /P<sub>corpo</sub> (mg/g)</b>	2.45±0.04	2.85±0.06 <sup>a</sup>	3.14±0.08 <sup>a,b</sup>
<b>RMR(l<sub>o2</sub>/h/KgP<sub>corpo</sub>)</b>	1.49±0.05	2.24±0.10 <sup>a</sup>	2.36±0.06 <sup>a,b</sup>
<b>TT<sub>3</sub>(ng/dl)</b>	57±6	140±12 <sup>a</sup>	128±7 <sup>a,b</sup>
<b>FT<sub>3</sub> (pg/dl)</b>	308±30	550±39 <sup>a</sup>	525±26 <sup>a,b</sup>

I valori sono espressi come valore medio±SEM. Per ogni valore sono stati utilizzati otto animali. RMR indica il metabolismo basale. TT<sub>3</sub> ed FT<sub>3</sub> indicano la triiodotironina totale e libera.

Il segno <sup>a</sup> indica valori significativamente differenti (P< 0.05) verso i ratti di controllo.

Il segno <sup>b</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti CE<sub>2</sub>.

### ***Attività della citocromo ossidasi***

L'attività dell'enzima citocromo ossidasi è stata aumentata dall'esposizione a freddo nell'omogenato di fegato, tale aumento è stato maggiore nei ratti esposti al freddo per dieci giorni .

Variazioni simili sono state riscontrate anche nell'attività della COX della popolazione mitocondriale totale dopo i differenti periodi di esposizione al freddo (*Tabella 2*).

Infatti, è stato osservato un significativo aumento dopo 2 giorni di esposizione alle basse temperature, ed un ulteriore incremento dopo altri 8 giorni di esposizione al freddo. Per quanto riguarda le frazioni mitocondriali in tutti i gruppi l'attività dell'enzima è stata maggiore nella frazione  $M_1$  e minore nella frazione  $M_{10}$ . Inoltre l'attività della COX è aumentata nelle frazioni mitocondriali  $M_1$  e  $M_3$  dopo 2 giorni di esposizione e nella frazione  $M_{10}$  dopo 10 giorni (*Tabella 2*).

### ***Contenuto epatico di proteine mitocondriali***

Il rapporto tra l'attività della COX nell'omogenato di fegato e nella popolazione mitocondriale totale ha fornito una valutazione approssimativa del contenuto epatico di proteine mitocondriali. Si è così trovato che due giorni di esposizione al freddo provocano un aumento del contenuto di proteine mitocondriale per grammo di tessuto, mentre altri 8 giorni di esposizione non comportano un ulteriore significativo aumento (*Figura 3A*). E' stato valutato anche il contenuto percentuale proteico di ciascuna frazione. Il contenuto percentuale delle proteine della frazione M<sub>10</sub> risulta significativamente inferiore rispetto a quello delle frazioni M<sub>1</sub> ed M<sub>3</sub> e non ha presentato differenze significative tra i vari gruppi. Al contrario, il contenuto proteico percentuale della frazione M<sub>1</sub>, che è più alto negli animali di controllo, è stato diminuito significativamente con l'esposizione al freddo, diventando più basso rispetto al contenuto della frazione M<sub>3</sub> che invece è aumentato (*Figura 3B*).

**Tabella 2**

**Effetti dell'esposizione al freddo sulle capacità ossidative del fegato e delle frazioni mitocondriali**

	<i>ANIMALI</i>		
	<b>C</b>	<b>CE<sub>2</sub></b>	<b>CE<sub>10</sub></b>
<b>Omogenato</b>	73.7±1.6	114.5±6.2 <sup>a</sup>	134.1±6.90 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>tot</sub></b>	1.08±0,07	1.22±0.04 <sup>a</sup>	1.32±0.02 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>1</sub></b>	1.23±0.08	1.48±0.06 <sup>a</sup>	1.57±0.07 <sup>a</sup>
<b>M<sub>3</sub></b>	1.01±0.06 <sup>c</sup>	1.19±1.11 <sup>a,c</sup>	1.28±0.01 <sup>a,c</sup>
<b>M<sub>10</sub></b>	0.41±0.04 <sup>c,d</sup>	0.46±0.02 <sup>c,d</sup>	0.69±0.07 <sup>a,b,c,d</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM. Per ogni valore sono stati utilizzati 8 animali. L'attività della COX è espressa in µmoli/O/min/g di fegato e in µmoli/O/min/mg di proteine mitocondriali.

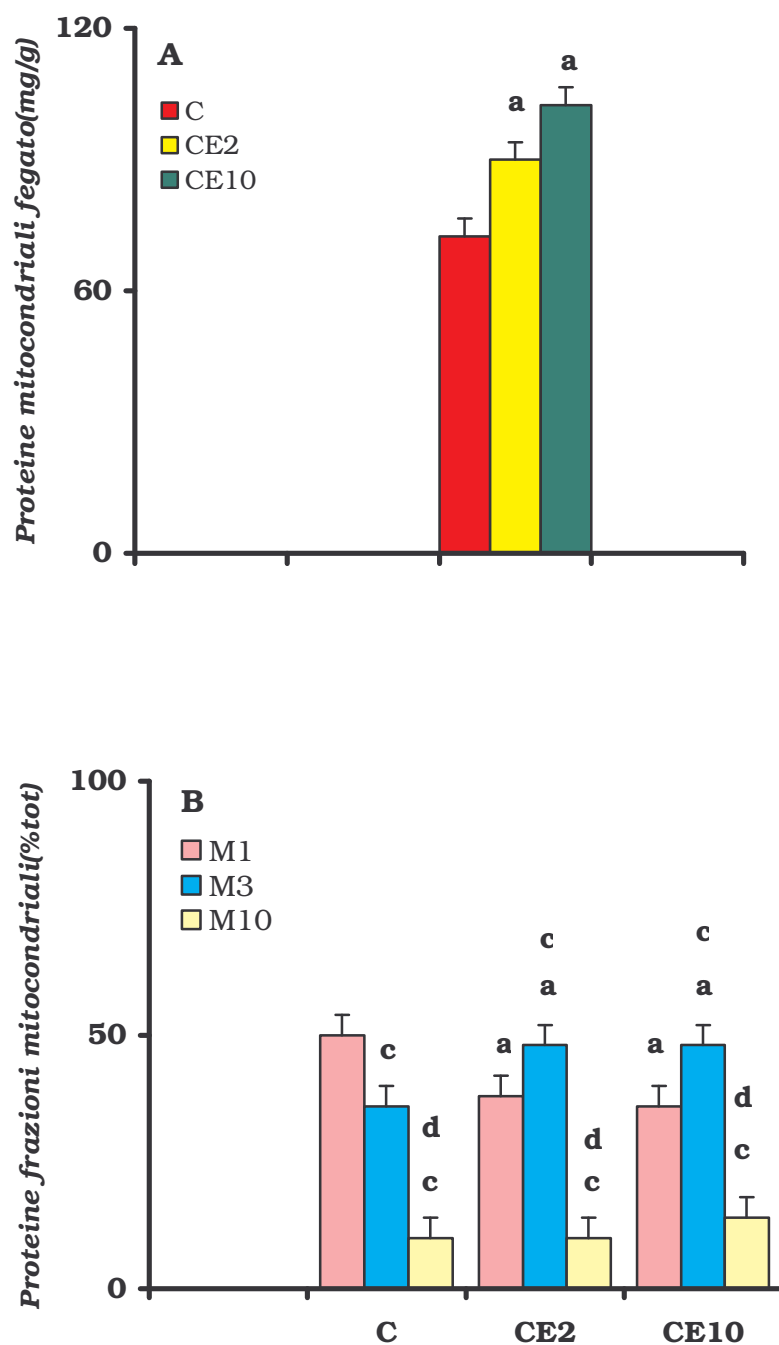
<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti di controllo.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti CE<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti verso la frazione M<sub>1</sub>.

<sup>d</sup> indica valori significativamente differenti verso la frazione M<sub>3</sub>.

P < 0,05 è stato scelto come limite di significatività.



**Figura 3:** Effetto dell'esposizione a freddo sul contenuto di proteine mitocondriali (A) e distribuzione della quantità di proteine nelle frazioni mitocondriali (B). I valori sono espressi come valore medio  $\pm$  SEM di otto esperimenti.

<sup>a</sup> significativo vs ratti C.

<sup>b</sup> significativo vs frazione M<sub>1</sub>.

<sup>c</sup> significativo vs frazione M<sub>3</sub>.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività



### ***Danno ossidativo epatico***

L'esposizione a freddo ha provocato un danno ossidativo sia nell'omogenato che nella popolazione mitocondriale totale di fegato di ratto (*Tabella 3*). Infatti, dopo due giorni di esposizione a freddo, si riscontra un aumento degli idroperossidi lipidici e dei carbonili proteici in tutti i gruppi e tale aumento è ulteriormente incrementato dopo dieci giorni di esposizione alle basse temperature. Tra le frazioni generalmente è stata riscontrata una maggiore estensione delle reazioni perossidative ed una maggiore formazione di carbonili nella frazione  $M_1$  che nelle frazioni  $M_3$  ed  $M_{10}$  ed in particolare è stato riscontrato un aumento del livello dei carbonili proteici nelle frazioni  $M_1$  ed  $M_{10}$  dopo due giorni di esposizione a freddo. Comunque non tutte le differenze sono risultate significative (*Tabella 3*).

**Tabella 3**

**Effetto dell'esposizione al freddo sui livelli di HP<sub>s</sub> e carbonili proteici**

<i>Preparati</i>	<i>Parametri</i>	<i>Animali</i>		
		<b>C</b>	<b>CE<sub>2</sub></b>	<b>CE<sub>10</sub></b>
<b>Omo</b>	HPs	0.88±0.02	1.10±0.07 <sup>a</sup>	1.38±0.04 <sup>a,b</sup>
	CO	2.14±0.10	3.03±0.14 <sup>a</sup>	3.59±0.07 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>tot</sub></b>	HPs	13.1±0.5	15.4±0.3 <sup>a</sup>	18.2±0.6 <sup>a,b</sup>
	CO	3.49±0.04	3.72±0.07	4.21±0.10 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>1</sub></b>	HPs	16.49±0.54	18.70±1.07	20.73±1.04 <sup>a</sup>
	CO	3.71±0.19	4.36±0.16 <sup>a</sup>	5.05±0.19 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>3</sub></b>	HPs	12.64±0.36 <sup>c</sup>	14.82±0.27 <sup>c</sup>	18.56±0.60 <sup>a</sup>
	CO	2.87±0.10 <sup>c</sup>	3.08±0.15 <sup>c</sup>	3.85±0.15 <sup>a,b,c</sup>
<b>M<sub>10</sub></b>	HPs	13.97±0.48 <sup>c</sup>	14.47±0.35 <sup>c</sup>	17.03±0.62 <sup>a,b,c</sup>
	CO	2.60±0.20 <sup>c</sup>	3.27±0.12 <sup>c</sup>	3.69±0.22 <sup>a,c</sup>

I valori sono espressi come valore medio±SEM. Per ogni valore sono stati utilizzati 8 animali. Gli idroperossidi sono espressi in pmol NADP/min/mg di proteine mitocondriali. I carbonili sono espressi in nmol/mg di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti C.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti CE<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti verso la frazione M<sub>1</sub>.

P < 0,05 è stato scelto come limite di significatività.

## ***Antiossidanti***

Nel tessuto epatico il contenuto di vitamina E non è stato influenzato dall'esposizione al freddo, mentre i livelli sia di CoQ<sub>9</sub> che di CoQ<sub>10</sub> sono aumentati dopo 10 giorni di esposizione al freddo, al contrario i livelli di GSH del tessuto sono diminuiti dopo 10 giorni di esposizione. Nella popolazione mitocondriale totale i livelli di vitamina E e di Coenzima Q<sub>9</sub> sono aumentati progressivamente durante l'esposizione a freddo mentre i livelli di coenzima Q<sub>10</sub> sono aumentati solo nei ratti esposti a freddo per dieci giorni. I livelli mitocondriali di GSH sono risultati ridotti dopo due giorni dall'esposizione, ma ripristinati ai valori di controllo dopo 10 giorni a freddo (*Tabella 4A*).

In tutti i gruppi, il contenuto di vitamina E è risultato più basso nella frazione M<sub>1</sub>. Inoltre, l'esposizione a freddo ha causato un incremento nei livelli dell' $\alpha$ -tocoferolo in tutte le tre frazioni.

Anche il contenuto di CoQ<sub>9</sub> è aumentato con l'esposizione a freddo. Infatti, i livelli di CoQ<sub>9</sub>, che non sono significativamente diversi tra le frazioni dei ratti di controllo, in seguito all'esposizione a freddo sono diventati più alti nella frazione M<sub>3</sub> rispetto alle frazioni M<sub>1</sub> e M<sub>10</sub>. I livelli di CoQ<sub>10</sub> sono aumentati in tutte le frazioni dopo 10 giorni di esposizione a freddo raggiungendo il valore più elevato nella frazione M<sub>10</sub>.

I livelli di GSH, che sono risultati più bassi nella frazione M<sub>10</sub>, rispetto alle altre due in tutti i gruppi, sono diminuiti dopo due giorni di esposizione a freddo in tutte le frazioni e sono ritornati ai livelli di

controllo dopo dieci giorni di esposizione a freddo. Per cui non vi sono state differenze tra ratti esposti al freddo e quelli di controllo (*Tabella 4B*).

**Tabella 4A**

<i>Preparati</i>	<i>Parametri</i>	<i>Animali</i>		
		<b>C</b>	<b>CE<sub>2</sub></b>	<b>CE<sub>10</sub></b>
<b>Fegato</b>	Vit E	31.95±1.17	30.62±1.11	33.56±1.10
	CoQ <sub>9</sub>	110.92±4.10	122.27±4.23 <sup>a</sup>	131.59±4.10 <sup>a</sup>
	CoQ <sub>10</sub>	11.62±0.67	13.72±1.25	15.86±0.95 <sup>a</sup>
	GSH	5.01±0.18	3.51±0.31 <sup>a</sup>	2.60±0.03 <sup>a</sup>
<b>M<sub>tot</sub></b>	Vit E	0.30±0.01	0.37±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.03 <sup>a,b</sup>
	CoQ <sub>9</sub>	1.58±0.04	1.81±0.06 <sup>a</sup>	2.11±0.10 <sup>a,b</sup>
	CoQ <sub>10</sub>	0.21±0.01	0.22±0.01	0.30±0.03 <sup>a,b</sup>
	GSH	17.6±0.6	13.3±1.5 <sup>a</sup>	18.2±1.9

I valori sono espressi come valore medio±SEM. Per ogni valore sono stati utilizzati otto animali. La vitamina E (vit E), il coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) e il coenzima Q<sub>9</sub> (CoQ<sub>9</sub>) sono espressi in nmol/g di tessuto.

Il segno <sup>a</sup> indica significativamente valori differenti (P< 0.05) verso i ratti di controllo.

Il segno <sup>b</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti CE<sub>2</sub>.

**Tabella 4B**

<i>Preparati</i>	<i>Parametri</i>	<i>Animali</i>		
		<b>C</b>	<b>CE<sub>2</sub></b>	<b>CE<sub>10</sub></b>
<b>M<sub>1</sub></b>	Vit E	0.24±0.01	0.31±0.02 <sup>a</sup>	0.39±0.02 <sup>a,b</sup>
	CoQ <sub>9</sub>	1.41±0.05	1.92±0.04 <sup>a</sup>	2.18±0.12 <sup>a</sup>
	CoQ <sub>10</sub>	0.15±0.01	0.18±0.02	0.24±0.01 <sup>a</sup>
	GSH	15.2±0.4	12.5±0.7 <sup>a</sup>	16.7±0.4 <sup>b</sup>
<b>M<sub>3</sub></b>	Vit E	0.34±0.02 <sup>c</sup>	0.42±0.02 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>a,b,c</sup>
	CoQ <sub>9</sub>	1.73±0.06	2.29±0.10 <sup>a</sup>	2.61±0.15 <sup>a,b,c</sup>
	CoQ <sub>10</sub>	0.19±0.01	0.26±0.02	0.31±0.03 <sup>a,c</sup>
	GSH	16.0±0.6	13.9±0.6 <sup>a</sup>	18.3±1.2 <sup>b</sup>
<b>M<sub>10</sub></b>	Vit E	0.34±0.02 <sup>c</sup>	0.49±0.03 <sup>a,c,d</sup>	0.51±0.02 <sup>a,c</sup>
	CoQ <sub>9</sub>	1.51±0.10	1.54±0.0 <sup>c,d</sup>	1.83±0.13 <sup>a,b,d</sup>
	CoQ <sub>10</sub>	0.23±0.02 <sup>c</sup>	0.25±0.02	0.37±0.03 <sup>a,b,c,d</sup>
	GSH	10.8±0.6 <sup>c,d</sup>	8.8±0.6 <sup>a,c,d</sup>	12.5±0.7 <sup>b,c,d</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM. Per ogni valore sono stati utilizzati 8 animali. I livelli della vitamina E, coenzima Q<sub>9</sub>, coenzima Q<sub>10</sub> e GSH sono espressi in nmol/mg di proteine.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti C.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti verso i ratti CE<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti verso la frazione M<sub>1</sub>.

<sup>d</sup> indica valori significativamente differenti verso la frazione M<sub>3</sub>.

P < 0,05 è stato scelto come limite di significatività.

## ***Velocità mitocondriale del consumo dell'ossigeno***

L'esposizione al freddo non ha modificato la velocità di consumo dell'ossigeno né in assenza, fase 4, né in presenza, fase 3, di ADP nei mitocondri totali supplementati con succinato. Nei mitocondri a cui è stato aggiunti piruvato/malato come substrato energetico, la fase 4 della respirazione non ha mostrato variazioni rispetto ai controlli in seguito all'esposizione a freddo. Il consumo di ossigeno della fase 3 è risultato aumentato dopo 2 giorni di esposizione al freddo ma non è stato aumentato ulteriormente al prolungarsi del periodo di esposizione a freddo (*Tabella 5A e 5B*).

Per quanto riguarda il consumo di ossigeno nelle frazioni in cui è stata divisa la popolazione mitocondriale in presenza di succinato ed in assenza di ADP (fase 4), nel gruppo di controllo, la frazione  $M_{10}$  ha presentato la più bassa velocità di consumo dell' $O_2$ , mentre nel gruppo degli esposti al freddo, questa velocità non è risultata significativamente differente da quella delle altre due frazioni. Inoltre, la velocità di respirazione della frazione  $M_{10}$  è stata l'unica a subire un aumento durante l'esposizione a freddo.

Sempre in presenza di succinato ma in presenza di ADP (fase 3) in tutti i gruppi, la velocità di respirazione è stata più alta nella frazione  $M_1$  e più bassa nella  $M_{10}$ , ed è stata incrementata, in seguito all'esposizione a freddo, solo nella frazione  $M_1$  (*Tabella 5A*).

Utilizzando come substrato il piruvato/malato, la velocità di respirazione durante la fase 4 non è variata con l'esposizione a freddo, ma

solo nel gruppo di controllo si è registrata una differenza significativa tra le frazioni  $M_1$  ed  $M_{10}$ .

La velocità di respirazione nella fase 3, è risultata più alta nella frazione  $M_1$  e più bassa nella frazione  $M_{10}$  in tutti i gruppi, non è stata dunque influenzata dall'esposizione a freddo. (*Tabella 5B*).



**Tabella 5A**

**Effetto dell'esposizione a freddo sul consumo di ossigeno delle frazioni mitocondriali di fegato di ratto in presenza di succinato.**

Gruppo	Frazione	Succinato		
		Fase 4	Fase 3	RCR
<b>C</b>	M <sub>tot</sub>	29.6 ± 1.0	198.7 ± 7.7	7.3 ± 0.6
	M <sub>1</sub>	34.8 ± 1.3	246.7 ± 13.0	7.5 ± 0.7
	M <sub>3</sub>	31.7 ± 2.0	196.4 ± 4.5 <sup>c</sup>	6.3 ± 0.4
	M <sub>10</sub>	20.4 ± 1.5 <sup>c,d</sup>	71.1 ± 6.5 <sup>c,d</sup>	2.7 ± 0.1
<b>CE<sub>2</sub></b>	M <sub>tot</sub>	31.5 ± 1.7	210.6 ± 2.9	6.9±0.3
	M <sub>1</sub>	35.1 ± 2.4	256.1 ± 10.7	7.5 ± 0.6
	M <sub>3</sub>	29.1 ± 2.1	196.0 ± 10.6 <sup>c</sup>	6.3 ± 0.5
	M <sub>10</sub>	28.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	70.7 ± 2.6 <sup>c,d</sup>	2.1 ± 0.2
<b>CE<sub>10</sub></b>	M <sub>tot</sub>	31.8±1.0	219.9 ± 8.4	6.9±0.3
	M <sub>1</sub>	37.7 ± 1.5	276.1 ± 11.1 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.5
	M <sub>3</sub>	31.9 ± 1.8	196.9 ± 4.5 <sup>c</sup>	6.7 ± 0.3
	M <sub>10</sub>	38.3 ± 3.2 <sup>a</sup>	68.2 ± 6.3 <sup>b,c</sup>	1.7 ± 0.2

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti. Le velocità di consumo di ossigeno sono espresse come nmol O/min/mg di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti CE<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti vs la frazione M<sub>1</sub>

<sup>d</sup> indica valori significativamente differenti vs la frazione M<sub>3</sub>

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

**TABELLA 5B**

**Effetto dell'esposizione a freddo sul consumo di ossigeno delle frazioni mitocondriali di fegato di ratto in presenza di piruvato/malato.**

Gruppo	Frazione	Piruvato/malato		
		Fase 4	Fase 3	RCR
<b>C</b>	M <sub>tot</sub>	9.0 ± 0.6	24.4 ± 1.8	3.3 ± 0.3
	M <sub>1</sub>	10.3 ± 0.7	32.2 ± 1.9	3.2 ± 0.3
	M <sub>3</sub>	9.4 ± 0.6	26.1 ± 0.9	3.3 ± 0.3
	M <sub>10</sub>	7.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	15.5 ± 0.7 <sup>c,d</sup>	1.9 ± 0.1
<b>CE<sub>2</sub></b>	M <sub>tot</sub>	10.2 ± 0.8	30.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.3
	M <sub>1</sub>	9.4 ± 0.6	34.3 ± 1.6	3.2 ± 0.3
	M <sub>3</sub>	9.4 ± 0.6	29.2 ± 1.1	3.3 ± 0.3
	M <sub>10</sub>	7.0 ± 0.5 <sup>c</sup>	16.3 ± 1.3 <sup>c,d</sup>	1.9 ± 0.1
<b>CE<sub>10</sub></b>	M <sub>tot</sub>	10.9 ± 0.7	33.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.2
	M <sub>1</sub>	10.8 ± 0.8	36.7 ± 2.5	3.0 ± 0.1
	M <sub>3</sub>	10.8 ± 0.4	28.7 ± 1.5 <sup>c</sup>	3.0 ± 0.2
	M <sub>10</sub>	9.3 ± 0.8	14.2 ± 1.4 <sup>c,d</sup>	1.8 ± 0.2

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti. Le velocità di consumo di ossigeno sono espresse come nmol O/min/mg di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti CE<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti vs frazione M<sub>1</sub>.

<sup>d</sup> indica valori significativamente differenti vs frazione M<sub>3</sub>.

P < 0,05 è scelto come livello di significatività.

## ***Velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

La velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte della popolazione mitocondriale totale durante la fase 4 della respirazione, e con il substrato legato al complesso II (succinato), è aumentato gradualmente con l'esposizione al freddo (*Tabella 6*).

Con i substrati legati al complesso I (piruvato/malato), la velocità è aumentata significativamente solo nel gruppo CE<sub>10</sub> e solo nella fase 4. Durante la fase 3 della respirazione e con il substrato legato al complesso I o II le velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non sono state modificate dal freddo (*Tabella 6*).

Per quanto riguarda le frazioni mitocondriali in presenza di succinato, sia nel gruppo C che CE<sub>10</sub>, la velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la fase 4 e la fase 3 della respirazione è stata più alta nella frazione M<sub>1</sub> che nelle altre due frazioni. Mentre nel gruppo CE<sub>2</sub> non si osservate differenze significative tra la frazione M1 ed M3 durante lo stato 3. La capacità di produrre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> della frazione mitocondriale M1 è stata aumentata sia durante la respirazione basale che quella stimolata dopo 10 giorni di esposizione a basse temperature e un analogo aumento è stato osservato dopo 2 giorni nella frazione M3. Inoltre, la velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte della frazione M10 è risultata aumentata, durante la respirazione basale dopo solo due giorni di esposizione a freddo, e dopo dieci giorni, durante la respirazione stimolata da ADP.

In presenza di piruvato/malato, le modificazioni indotte dal freddo sono risultate simili a quelle osservate in presenza di succinato, ma non si sono registrate reazioni nel rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  in fase 3 (*Tabella 6*).

**TABELLA 6**

**Effetto dell'esposizione a freddo sul rilascio di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Frazione	substrato/aggiunto	Gruppo		
		C	CE <sub>2</sub>	CE <sub>10</sub>
<b>M<sub>tot</sub></b>	Succinato	104.9 ± 1.1	114.9 ± 1.7 <sup>a</sup>	123.9 ± 0.8 <sup>a,b</sup>
	Succinato+ADP	58.3 ± 1.8	61.3 ± 1.1	62.7 ± 1.4
	Piruvato/malato	239.1 ± 2.1	244.6 ± 2.8	271.1 ± 1.2 <sup>a,b</sup>
	Piruvato/malato+ADP	172.0 ± 2.0	169.7 ± 3.1	168.8 ± 1.3
<b>M<sub>1</sub></b>	Succinato	119.6 ± 4.3	121.1 ± 1.6	134.7 ± 5.3 <sup>a,b</sup>
	Succinato+ADP	68.6 ± 4.1	69.1 ± 2.2	78.2 ± 2.2 <sup>a,b</sup>
	Piruvato/malato	259.2 ± 1.5	264.3 ± 3.8	283.0 ± 4.4 <sup>a,b</sup>
	Piruvato/malato+ADP	172.5 ± 1.3	177.5 ± 1.1	181.1 ± 7.3
<b>M<sub>3</sub></b>	Succinato	81.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	109.1 ± 1.7 <sup>a,c</sup>	120.1 ± 1.1 <sup>a,b</sup>
	Succinato+ADP	53.2 ± 0.9 <sup>b</sup>	63.3 ± 4.1 <sup>a</sup>	66.4 ± 1.7 <sup>a,b</sup>
	Piruvato/malato	239.9 ± 4.4 <sup>b</sup>	257.3 ± 1.9 <sup>a</sup>	263.0 ± 1.8 <sup>a,b</sup>
	Piruvato/malato+ADP	164.7 ± 1.8	172.6 ± 2.5	168.3 ± 3.5 <sup>b</sup>
<b>M<sub>10</sub></b>	Succinato	60.7 ± 1.7 <sup>b,c</sup>	102.0 ± 1.0 <sup>a,c</sup>	113.0 ± 1.7 <sup>a,b,c</sup>
	Succinato+ADP	37.0 ± 1.1 <sup>b,c</sup>	41.5 ± 2.4	52.0 ± 2.1 <sup>a,b,c,d</sup>
	Piruvato/malato	193.3 ± 4.7 <sup>b,c</sup>	205.8 ± 1.1 <sup>a,c,d</sup>	210.4 ± 7.4 <sup>a,c,d</sup>
	Piruvato/malato+ADP	154.3 ± 2.5	157.1 ± 1.2 <sup>c,d</sup>	161.3 ± 2.7 <sup>c</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti. Le velocità di rilascio dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono espresse come pmol/min/mg di proteine mitocondriali.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti CE<sub>2</sub>

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti vs frazione M<sub>1</sub>

<sup>d</sup> indica valori significativamente differenti vs frazione M<sub>3</sub>

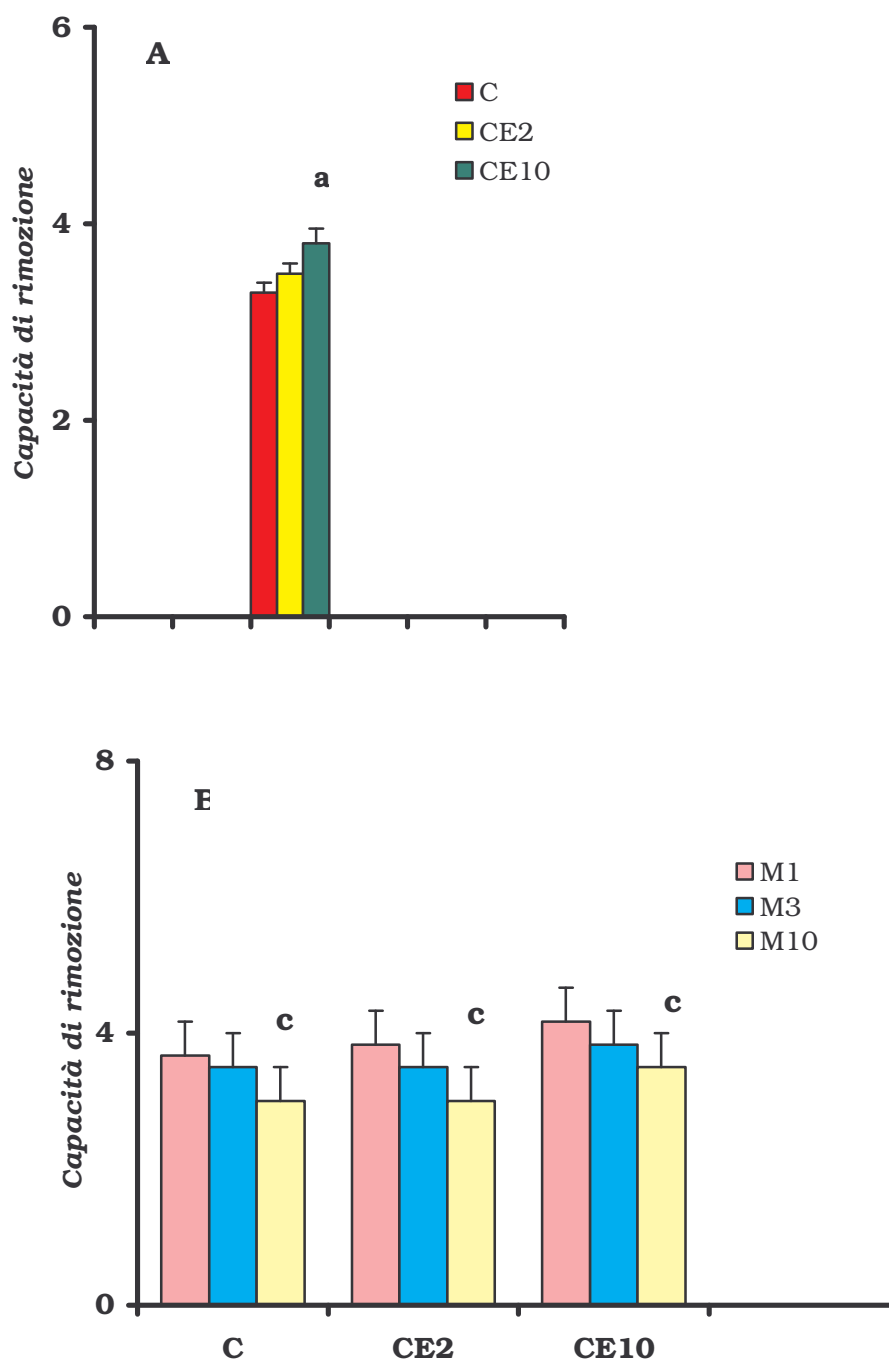
P < 0,005 è scelto come livello di significatività.

### ***Capacità di rimozione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

La capacità dei mitocondri di rimuovere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata espressa come concentrazione equivalente di desferiossamina (nmol/mg). Tale capacità non è aumentata significativamente nei ratti CE<sub>2</sub> ma è risultata significativamente maggiore nei ratti CE<sub>10</sub>.

La capacità delle tre frazioni di rimuovere l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non è stata influenzata dall'esposizione a freddo. Sia negli animali di controllo che negli esposti a freddo, non si sono evidenziate significative differenze tra le frazioni M<sub>1</sub> e M<sub>3</sub>; mentre tale capacità di rimozione è risultata significativamente più bassa nella frazione M<sub>10</sub> rispetto alla frazione M<sub>1</sub> (Figura 4).

**FIGURA 4**



**Figura 4:** Effetto dell'esposizione a freddo sulla capacità della popolazione totale (A) e delle frazioni mitocondriali (B) di rimuovere  $H_2O_2$ , espressa come concentrazione equivalente di desferossiamina (nmol/mg di proteine). I valori sono espressi come valore medio  $\pm$  SEM di otto esperimenti.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs i ratti C

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti vs la frazione M<sub>1</sub>.

P < 0,005 è scelto come livello di significatività

### *Suscettibilità allo stress ossidativo*

La relazione tra l'emissione di luce (E) e la concentrazione degli omogenati stressati con perborato di sodio è descritta dall'equazione seguente:

$$E = a \cdot C / \exp(b \cdot C)$$

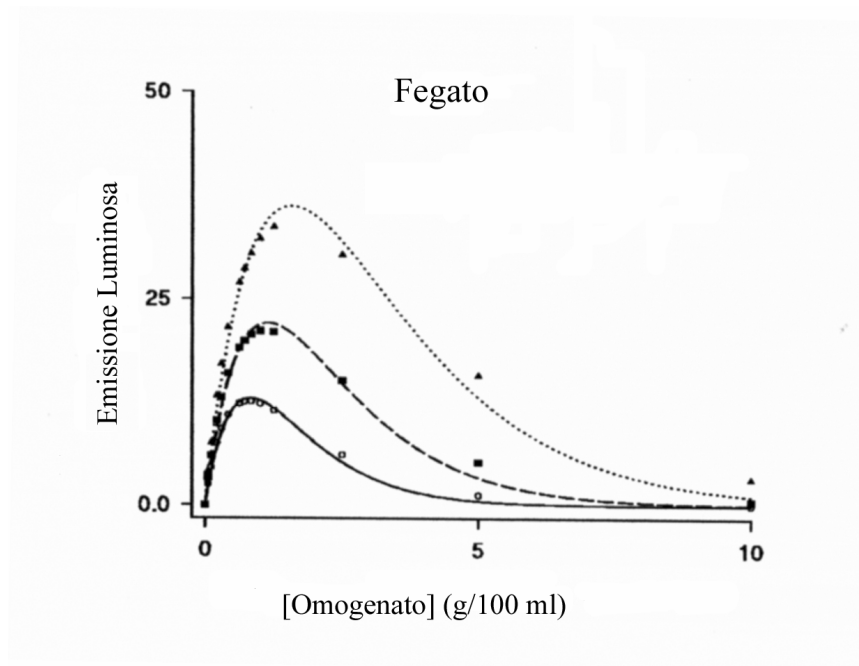
In tale equazione il valore di  $a$  dipende da sostanze, come i citocromi, in grado di reagire con  $H_2O_2$  e produrre radicali  $\cdot OH$ , mentre  $b$  dipende dalla concentrazione di sostanze in grado di prevenire la formazione o l'interazione con i radicali idrossilici, riducendo, quindi, i livelli di emissione luminosa. Tali livelli sono risultati più bassi nell'omogenato di fegato di ratti di controllo rispetto ai CE<sub>2</sub> e CE<sub>10</sub>. Poiché i livelli di emissione luminosa, e principalmente l'emissione massima ( $E_{max} = a/e \cdot b$ ) rappresentano un indice della suscettibilità allo stress ossidativo delle sospensioni tissutali (Venditti *et al.*, 1999), le suddette differenze, nei livelli di emissione luminosa, suggeriscono che la suscettibilità agli ossidanti dell'omogenato dei ratti CE sono più alte rispetto ai ratti di controllo. Nella popolazione mitocondriale totale l'analisi delle curve ha mostrato che la suscettibilità nei mitocondri di controllo è la più bassa e che gli aumenti, di questa, indotti dal freddo sono relazionati ai periodi di esposizione al freddo. Per quanto riguarda le sottopopolazioni mitocondriali in cui è stata divisa la popolazione totale le curve in figura 7 mostrano che la suscettibilità allo stress ossidativo della frazione M<sub>1</sub> è stata più alta di quella delle frazioni M<sub>3</sub> e M<sub>10</sub> in tutti i gruppi considerati. La più elevata emissione delle frazioni M<sub>1</sub> è dovuta sia ad un valore di "a"



più alto, sia ad un valore di “b” più basso (*Tabella 7*). L'esposizione a freddo ha causato un aumento della suscettibilità allo stress da parte delle frazioni mitocondriali. Queste valutazioni qualitative sono confermate dai valori di  $E_{max}$ , i quali appaiono essere correlati ai valori dell'attività della COX. Invece non esiste una simile correlazione tra i valori di “b” ed i livelli antiossidanti, a conferma di precedenti osservazioni, che questi valori dipendono anche dalle concentrazioni di particolari sostanze, che mancano nelle convenzionali attività antiossidanti. (Di Meo *et al.*, 1996).

**Figura 5A**

**Risposta allo stress ossidativo di omogenato di fegato**

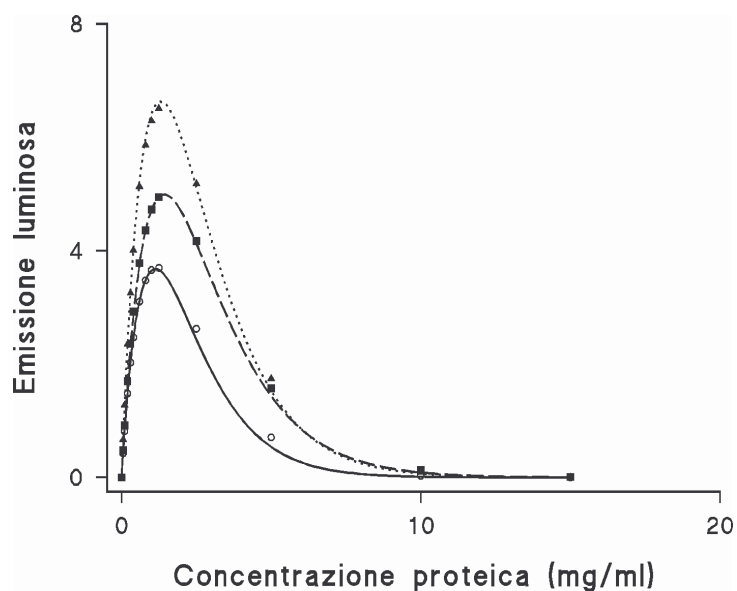


La suscettibilità allo stress è stata valutata determinando le variazioni con la concentrazione dell'emissione di luce di una reazione luminescente. I valori di emissione sono espressi come percentuali di uno standard arbitrario (44 ng/ml di perossidasi). Le curve sono state costruite utilizzando dati sperimentali e l'equazione:  $E = a \cdot C / \exp(b \cdot C)$ .

Gli omogenati di ratti normali sono indicati dalla linea continua. Gli omogenati di ratti CE<sub>2</sub> sono indicati dalla linea tratteggiata. Gli omogenati di ratti CE<sub>10</sub> sono indicati dalla linea a puntini.

**Figura 5B**

**Risposta allo stress ossidativo di mitocondri di fegato di ratto**

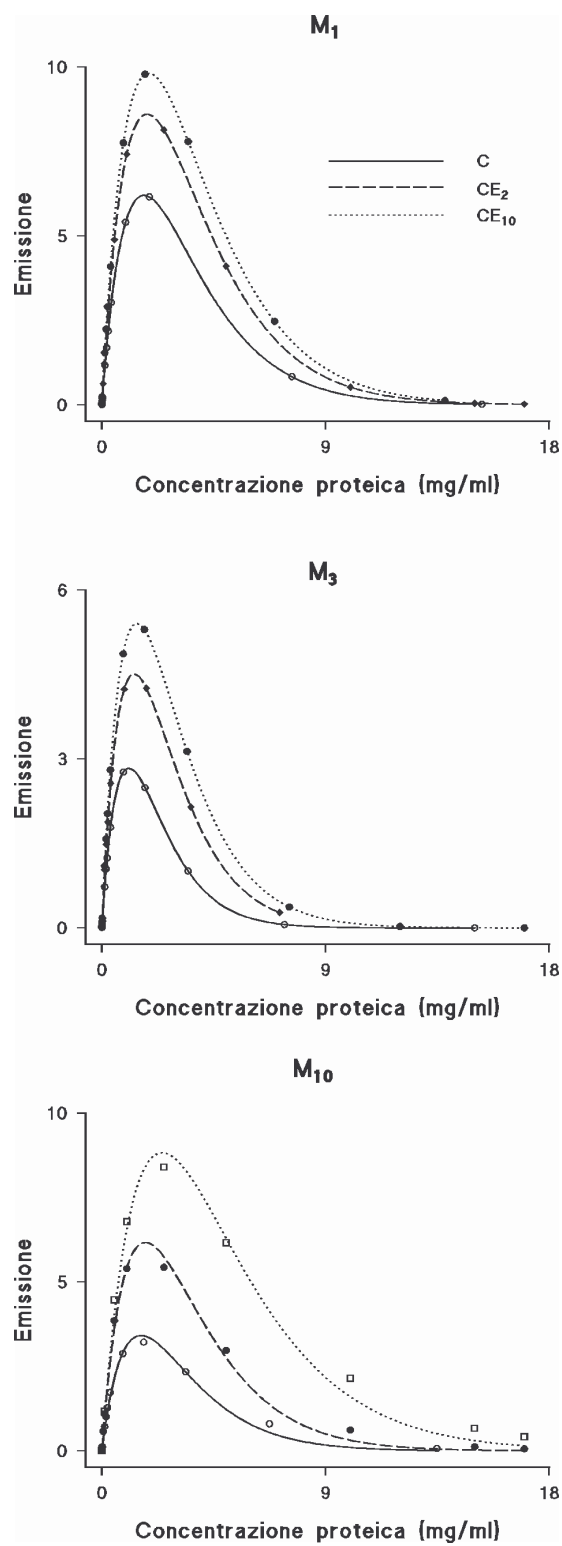


La suscettibilità allo stress è stata valutata determinando le variazioni con la concentrazione dell'emissione di luce di una reazione luminescente. I valori di emissione sono espressi come percentuali di uno standard arbitrario (44 ng/ml di perossidasi). Le curve sono state costruite utilizzando dati sperimentali e l'equazione:  $E = a \cdot C / \exp(b \cdot C)$ .

I mitocondri di ratti normali sono indicati dalla linea continua. Gli omogenati di ratti CE<sub>2</sub> sono indicati dalla linea tratteggiata. Gli omogenati di ratti CE<sub>10</sub> sono indicati dalla linea a puntini.

**Figura 5C**

**Risposta allo stress ossidativo *in vitro* di frazioni mitocondriali di fegato di ratto.**



**Tabella 7**

**Effetti dell'esposizione a freddo sui parametri che caratterizzano lo stress ossidativo delle frazioni mitocondriali.**

<i>Preparati</i>	<i>Parametri</i>	<i>ANIMALI</i>		
		<b>C</b>	<b>CE<sub>2</sub></b>	<b>CE<sub>10</sub></b>
<b>OMO</b>	a	49.2±2.4	60.4±4.2 <sup>a</sup>	76.4±3.2 <sup>a,b</sup>
	b	1.38±0.07	1.08±0.07 <sup>a</sup>	0.77±0.04 <sup>a,b</sup>
	E <sub>max</sub>	13.1±0.7	20.5±1.3 <sup>a</sup>	36.5±1.5 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>tot</sub></b>	a	8.8 ± 0.2	9.5±0.7	13.7±0.8 <sup>a,b</sup>
	b	0.88±0.07	0.70±0.02	0.73±0.06 <sup>a,b</sup>
	E <sub>max</sub>	3.6±0.3	4.9±0.4 <sup>a</sup>	6,6±0.5 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>1</sub></b>	a	9.93±0.44	10.47±0.54	13.64±0.43 <sup>a</sup>
	b	0.66±0.02	0.57±0.03	0.51±0.03
	E <sub>max</sub>	5.5±0.4	6.8±0.6	9.8±0.6 <sup>a,b</sup>
<b>M<sub>3</sub></b>	a	7.41±0.44	8.21±1.1 <sup>c</sup>	9.79±0.86 <sup>c</sup>
	b	0.96±0.07 <sup>c</sup>	0.75±0.06 <sup>a</sup>	0.71±0.04 <sup>a</sup>
	E <sub>max</sub>	2.8±0.2 <sup>c</sup>	4.0±0.3 <sup>c</sup>	5.1±0.4 <sup>a,c</sup>
<b>M<sub>10</sub></b>	a	7.36±0.36	11.32±0.91 <sup>a,c,d</sup>	11.83±1.00 <sup>a</sup>
	b	0.79±0.11 <sup>d</sup>	0.68±0.07	0.51±0.01 <sup>a</sup>
	E <sub>max</sub>	3.0±0.3 <sup>c</sup>	6.1±0.7 <sup>a,d</sup>	8.5±0.8 <sup>a,b,d</sup>

I valori sono espressi come valore medio ± SEM di otto esperimenti.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C.

<sup>b</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti CE<sub>2</sub>

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti vs frazione M<sub>1</sub>.

<sup>d</sup> indica valori significativamente differenti vs frazione M<sub>3</sub>

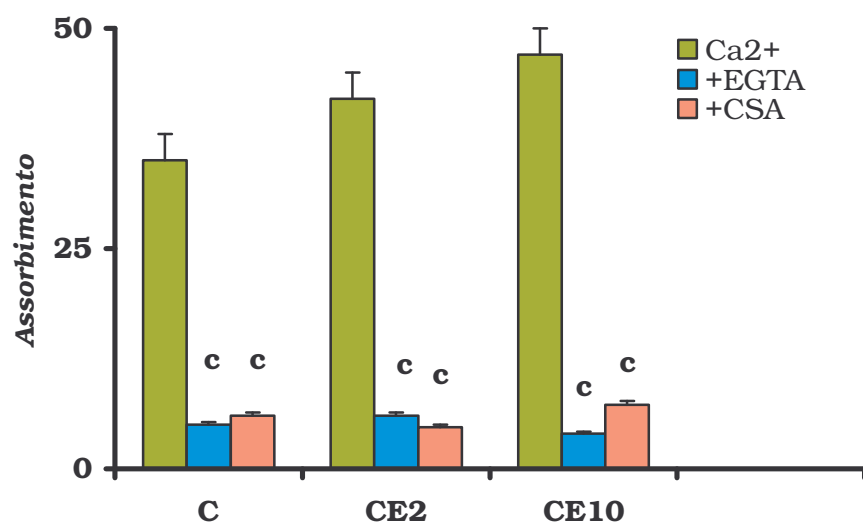
P < 0,005 è scelto come livello di significatività.

## ***Swelling mitocondriale e potenziale elettrico di membrana.***

Nella popolazione mitocondriale totale l'estensione dello swelling in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  è risultato significativamente aumentato solo nei mitocondri isolati da fegato di ratti esposti a freddo per dieci giorni. Lo swelling mitocondriale osservato era ridotto drasticamente in presenza di ciclosporina A (CSA) e di EGTA, il che sta ad indicare che in tale processo era coinvolta la formazione di pori di transizione di permeabilità. Lo swelling era preceduta dalla caduta del potenziale di membrana a cavallo tra la matrice e lo spazio intermembrana della membrana interna ( $\Delta\Psi$ ); tale caduta di potenziale era maggiore nei ratti esposti a freddo (*Figura 6A*). Nelle frazioni mitocondriali in tutti i gruppi il grado di swelling indotto dal  $\text{Ca}^{2+}$  è stato più alto nella frazione  $M_1$  e più basso nella frazione  $M_{10}$ . Inoltre, dopo 10 giorni di esposizione a freddo, è stato riscontrato un aumento significativo in tutte le frazioni e solo nella frazione  $M_3$  tale incremento si verifica già dopo 2 giorni di esposizione a freddo.

Anche nelle frazioni lo swelling mitocondriale è drasticamente ridotto dall'EGTA e dalla CSA (risultati non riportati), il che conferma anche in questo caso il ruolo svolto dai pori di transizione di permeabilità. Oltretutto, lo swelling indotto dal  $\text{Ca}^{2+}$  è stato preceduto da una rapida diminuzione del potenziale di membrana ( $\Delta\Psi$ ), la cui dipendenza dalla frazione e dal trattamento è simile a quello dello swelling (*Figura 6B*).

**Figura 6A**

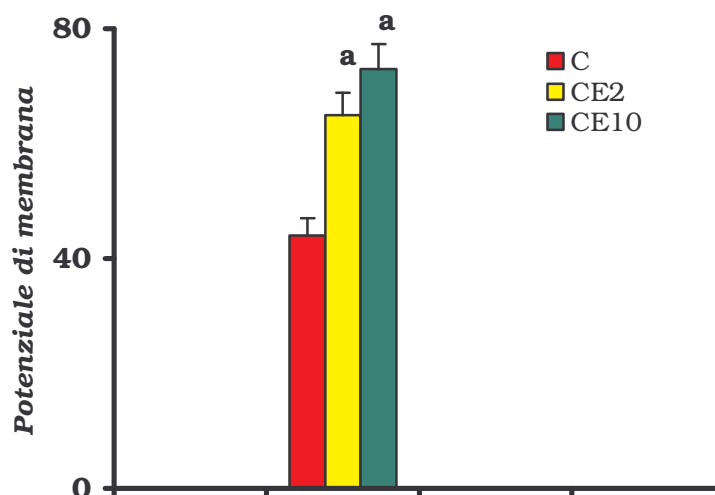


Lo swelling mitocondriale è stato misurato come decremento dell'assorbanza a 540nm, ed è espresso come percentuale del valore iniziale prima dell'aggiunta di Ca<sup>2+</sup>.

I valori sono espressi come valore medio  $\pm$  SEM.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C

<sup>c</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C in presenza del solo Ca<sup>2+</sup>.

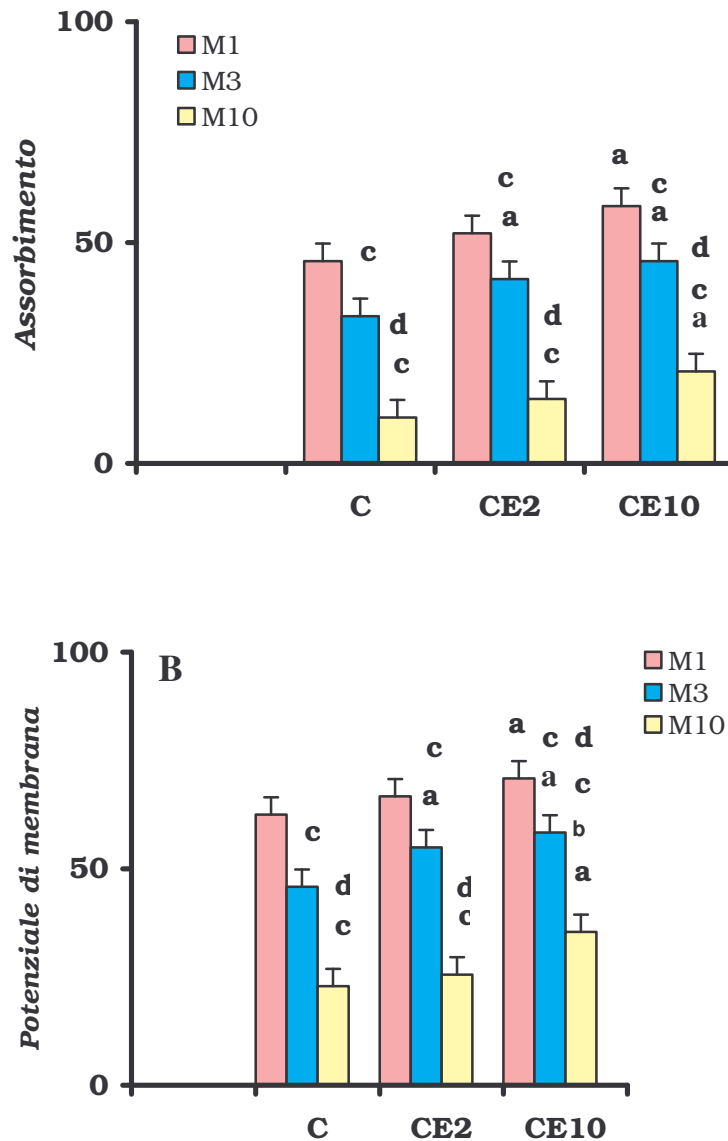


Per ogni valore sono stati utilizzati otto animali.

I valori sono espressi come valore medio  $\pm$  SEM.

<sup>a</sup> indica valori significativamente differenti vs ratti C.

**FIGURA 6B**



**Figura 6B:** Effetto dell'esposizione a freddo sullo swelling indotto dal  $\text{Ca}^{2+}$  e sulla variazione del potenziale di membrana  $\Delta\Psi$  di frazioni mitocondriali di fegato di ratto.

I valori sono espressi come valore medio  $\pm$  SEM di otto esperimenti.

<sup>a</sup> significativo vs ratti C.

<sup>b</sup> significativo vs la frazione  $\text{CE}_2$ .

<sup>c</sup> significativo vs la frazione  $\text{M}_1$ .

<sup>d</sup> significativo vs la frazione  $\text{M}_3$ .

$P < 0,05$  è scelto come livello di significatività.



# Discussione

Il progetto di ricerca effettuato in questi tre anni è stato volto ad analizzare gli effetti dell'esposizione a freddo sul danno ossidativo epatico nel ratto, valutando in primo luogo l'effetto delle basse temperature sul tessuto, e successivamente sui mitocondri da esso isolati.

L'esposizione di animali omeotermi alle basse temperature ambientali elicitava adattamenti fisiologici, necessari alla sopravvivenza, che sono mediati da numerosi ormoni di alcuni dei quali non si conosce ancora né il ruolo preciso né l'entità degli effetti provocati. Un ruolo sostanziale, però, è certamente da attribuire agli ormoni tiroidei.

Nel presente studio è stato osservato un aumento nei livelli serici di FT<sub>3</sub> e FT<sub>4</sub> e del metabolismo basale cellulare sia dopo 2 giorni che dopo 10 giorni di esposizione al freddo. Tali risultati sono in accordo con precedenti ricerche in base alle quali:

1 i livelli degli ormoni tiroidei aumentano velocemente (già dopo due ore) nei ratti esposti al freddo e rimangono elevati durante una lunga esposizione (15-25 giorni) (Goglia *et al.*, 1983);

2 l'aumento del metabolismo basale è strettamente associato alle variazioni dei livelli serici degli ormoni tiroidei, mentre l'aumento del rapporto fra il peso cuore ed il peso corporeo è un effetto tardivo delle modificazioni dello stato tiroideo (De Martino Rosaroll *et al.*, 1996).

L'aumentata capacità di produrre calore, che caratterizza l'acclimatazione metabolica al freddo, deriva dall'aumento del metabolismo ossidativo in molti tessuti.

La citocromo ossidasi (COX), è l'enzima finale della catena respiratoria, e l'attività in vitro di preparati tissutali è stata correlata con

il loro massimo consumo di ossigeno (Simon e Robin, 1971). Per questo motivo tale attività può essere utilizzata come parametro di misura della massima capacità del metabolismo aerobico di un tessuto. L'aumento dell'attività della COX è stata riscontrata in svariati tessuti di ratto, in seguito ad una prolungata esposizione al freddo (Barré et al., 1987; Terblanche et al., 2000).

Nel presente lavoro sono stati riscontrati lievi aumenti nell'attività della COX nell'omogenato di fegato dopo 2 giorni di esposizione al freddo, nonché aumenti maggiori dopo 10 giorni di esposizione. Tali variazioni concordano con il fatto che, nell'acclimatazione a freddo, l'attività muscolare durante la termogenesi da brivido viene gradualmente sostituita da una termogenesi in assenza di brivido (Foster e Frydman, 1979).

L'aumento dell'attività della COX, riscontrato nei ratti esposti al freddo, può essere attribuito ad un incremento dei livelli serici degli ormoni tiroidei, dal momento che aumenti analoghi sono stati riscontrati anche nei tessuti di ratti resi ipertiroidi sperimentalmente (Winder e Holloszy, 1977; Venditti et al., 1996; Venditti et al., 2003 a, b).

L'ipertiroidismo sperimentale induce anche cambiamenti biochimici che predispongono i tessuti al danno ossidativo indotto da radicali liberi, accelerando la produzione di ROS (Fernandez e Videla 1993; Swaroop e Ramasarma, 1985; Venditti et al., 2003; a,b) incrementando la suscettibilità dei tessuti ai loro effetti (Videla 2000).

E' plausibile pensare che simili cambiamenti si verifichino anche in seguito all'instaurarsi di uno stato di ipertiroidismo indotto dal freddo.

Gli effetti delle basse temperature sul danno ossidativo tissutale sono stati scarsamente studiati, anche se ci sono dati che indicano un aumento dei prodotti della perossidazione lipidica nel cuore e nel fegato (Kolosova et al. 1995). Anche i risultati della nostra ricerca, mostrano un incremento significativo di entrambi i parametri già dopo 2 giorni di esposizione al freddo ed ulteriori aumenti dopo 10 giorni. Gli effetti ossidativi dei differenti periodi di esposizione a freddo potrebbero essere dovuti a cambiamenti biochimici gradualmente influenzanti la produzione di radicali liberi e/o il sistema di difesa antiossidanti.

Sebbene l'ipotesi che i componenti della catena respiratoria mitocondriale rispondano come un'unità allo stato tiroideo dell'animale (Nishiki et al., 1978) non sembra essere applicabile a tutti i tessuti (Horrum et al., 1985), le modificazioni dell'attività della COX possono fornire utili indicazioni sul contenuto tissutale di altri componenti della catena respiratoria, inclusi i trasportatori di elettroni autossidabili. Quindi, i risultati riguardanti le variazioni dell'attività della COX mitocondriale, suggeriscono un aumento nel contenuto di citocromi mitocondriali, o un aumento nel numero di mitocondri per cellula, che potrebbe tradursi in una elevata produzione di radicali liberi nel tessuto epatico dei ratti.

Finora non sono stati condotti studi sugli effetti di brevi periodi di esposizione al freddo sulle difese antiossidanti del fegato e quindi non è possibile escludere che una diminuzione delle capacità antiossidanti dei tessuti stessi possa giocare un ruolo fondamentale nell'influenzare la loro suscettibilità ai processi ossidativi. L'analisi delle concentrazioni di

antiossidanti liposolubili presenti nelle membrane cellulari, come la vitamina E (VE) e il coenzima Q (CoQ), ed idrosolubili come il  $\gamma$ -glutamil-cistein-glicina (GSH), sono stati importanti al fine di valutare l'effetto delle basse temperature sul sistema antiossidante tissutale.

Come detto, la VE è la più importante vitamina liposolubile impiegata come antiossidante contro la perossidazione lipidica e il danno ossidativo indotto dai radicali liberi (Tappel, 1972). Il CoQ (o Ubichinone), è un componente essenziale di tutte le membrane cellulari dei mammiferi, dove svolge un ruolo fondamentale come antiossidante funzionando direttamente come uno scavenger di radicali liberi (Ernster et al., 1992) o lavorando in maniera sinergica con la VE (Kagan et al., 1990). Il GSH è il più abbondante tiolo a basso peso molecolare presente in tutte le cellule dei mammiferi. Esso è coinvolto in molti processi cellulari in cui svolge una funzione antiossidante che sembra essere dovuta proprio alla presenza del suo gruppo tiolico.

In generale, i nostri risultati indicano che il danno ossidativo epatico di ratti esposti al freddo è scarsamente correlato all'attività di tali molecole. Tuttavia è molto difficile determinare l'influenza di una condizione di stress ossidativo su un sistema così complesso qual è quello antiossidante, in cui lavorano una serie di componenti le cui azioni si integrano e si intrecciano in vario modo. E' vero comunque che i cambiamenti che si verificano nei singoli componenti del sistema di difesa antiossidante sono tali da ridurre in maniera sostanziale l'efficacia globale di tale sistema.

Questo potrebbe potenziare l'effetto dell'incremento della produzione dei radicali liberi, determinando un aumento del danno ossidativo a lipidi e proteine. La variazione delle difese antiossidanti, inoltre, potrebbe essere la causa dell'aumento della suscettibilità del tessuto epatico al danno ossidativo osservato. Nel presente lavoro le variazioni ossidative risultanti dall'esposizione del tessuto *in vitro* all'azione diretta di un ossidante ( $H_2O_2$ ) sono state utilizzate, come modello delle alterazioni che si verificano *in vivo* in seguito a cambiamenti fisiologici che inducono un aumento nel rilascio di perossido di idrogeno dai mitocondri. I nostri risultati indicano che la suscettibilità allo stress ossidativo di omogenati prelevati da ratti CE<sub>2</sub> e CE<sub>10</sub>, è più alta rispetto a quella degli animali di controllo. L'incremento della suscettibilità agli ossidanti indotta dal freddo, è dovuta essenzialmente all'aumento del parametro  $\alpha$ , il cui valore dipende dalla concentrazione di sostanze, come le emoproteine, in grado di reagire con  $H_2O_2$  producendo il radicale ossidrilico altamente reattivo. Le variazioni del valore di  $\alpha$  sono in accordo con le nostre osservazioni che l'esposizione al freddo induce un aumento nell'attività della COX simile a quello che si riscontra nel fegato di ratti resi ipertiroidi sperimentalmente (Venditti et al., 2003; Lopez Torres et al., 2000).

In definitiva, le nostre indagini relative al tessuto epatico, suggeriscono che durante l'esposizione alle basse temperature, l'induzione da parte degli ormoni tiroidei dei componenti della catena respiratoria gioca un ruolo fondamentale nell'acclimatazione alle basse temperature, ma è pagata al caro prezzo dell'aumento della produzione di ROS e quindi dell'ossidazione delle molecole biologiche. Poiché la principale fonte

cellulare di ROS, come detto, è quella mitocondriale, il passo successivo del nostro studio è stato quello di verificare, se con l'esposizione a freddo aumenta nei mitocondri totali la velocità di produzione di ROS ed il danno ossidativo.

I dati riportati in questo lavoro, mostrano che l'esposizione al freddo induce un aumento nella velocità di rilascio di  $H_2O_2$  da parte dei mitocondri totali soltanto durante la fase 4 della respirazione. Nonostante ciò sicuramente il rilascio mitocondriale di ROS contribuisce in misura notevole allo stress ossidativo epatico osservato, dal momento che l'esposizione a freddo determina un aumento del contenuto di proteine mitocondriali per grammo di tessuto. Questo si traduce in un aumento del flusso delle ROS dai mitocondri al compartimento citosolico.

Inoltre, l'esposizione a freddo provoca un aumento della capacità mitocondriale di rimozione dell'  $H_2O_2$  , il che indica che le differenze nel rilascio di  $H_2O_2$  riflettono differenti capacità dei mitocondri di produrre  $H_2O_2$  durante la fase 4 della respirazione, e suggerisce la possibilità che la produzione di  $H_2O_2$  aumenti anche durante la fase 3 della respirazione. La velocità della produzione di  $H_2O_2$  da parte di mitocondri isolati dipende dalla concentrazione dei carriers elettronici autossidabili in forma ridotta (Boveris et al.,1973). L'aumento dell'attività della Citocromo Ossidasi e del contenuto di Coenzima Q, indotto dal freddo, è a favore dell'ipotesi che anche la concentrazione di altri carriers autossidabili, possa aumentare in seguito all'esposizione alle basse temperature. Poiché, al contrario, il flusso di elettroni (e quindi il consumo di  $O_2$  ) non è significativamente

modificato nella fase 4, non si capisce come mai in tale fase, la velocità di produzione dell'  $\text{H}_2\text{O}_2$  sia più alta nei mitocondri dei ratti esposti a freddo rispetto a quelli di controllo. Nella fase 3 della respirazione, invece, il grado di riduzione dei trasportatori elettronici, e, quindi, la velocità di produzione dell'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , decrescono in tutti i preparati mitocondriali a causa del più rapido flusso elettronico. Infatti in tale fase le differenze nel rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  tra ratti di controllo ed esposti a freddo, scompaiono.

E' possibile che l'aumentato flusso elettronico indotto dal freddo e l'aumentata efficacia del sistema di rimozione dell'  $\text{H}_2\text{O}_2$ , facciano sì che il perossido d'idrogeno sia rilasciato alla stessa velocità da mitocondri supplementati con piruvato/malato, provenienti da ratti di controllo ed esposti a freddo.

Durante la fase 3 della respirazione in presenza di succinato, il flusso di elettroni non è modificato dal freddo e la mancanza di aumento nella velocità di rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  nei ratti esposti a freddo potrebbe ascriversi ad una compensazione tra gli aumenti della produzione e gli aumenti della rimozione di idroperossidi.

I mitocondri, oltre ad essere il principale sito generatore di ROS, rappresentano anche il principale bersaglio della loro azione (Di Meo et al., 1996), cosicché, variazioni nella produzione di ROS si riflettono nelle variazioni del danno ossidativo alle strutture mitocondriali. A conferma di ciò è stato trovato un generale aumento dei livelli degli idroperossidi lipidici e dei carboni proteici, dopo 2 giorni di esposizione a freddo, ed un ulteriore aumento dopo altri 8 giorni.



Anche la diminuzione delle difese antiossidanti mitocondriali potrebbe contribuire all'aumentato danno ossidativo riscontrato nei ratti esposti a freddo. Per i mitocondri totali sono stati valutati il contenuto di Coenzima Q, vit E e GSH. I livelli di antiossidanti non enzimatici a basso peso molecolare sono influenzati dall'esposizione a freddo in modo non uniforme per cui le informazioni che si possono ricavare sulla capacità antiossidante globale sono scarse. Modificazioni delle caratteristiche biochimiche dei mitocondri indotte dal freddo, potrebbero alterare la loro suscettibilità all'attacco ossidativo e aumentare, quindi, l'estensione del danno alle loro strutture. Per tale motivo, un approccio utile per testare gli effetti dei cambiamenti biochimici indotti dal freddo sulla suscettibilità allo stress ossidativo dei mitocondri, è stato quello di sottoporre i preparati mitocondriali all'attacco diretto da parte di sostanze ossidanti in vitro per valutare la loro risposta. I nostri risultati indicano che la suscettibilità agli ossidanti è maggiore nei mitocondri del fegato dei ratti esposti a freddo; nei ratti esposti per dieci giorni, questa aumentata suscettibilità è essenzialmente attribuibile all'aumentato contenuto mitocondriale di complessi del  $\text{Fe}^{2+}$ .

E' stato poi utilizzato lo swelling mitocondriale in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  e la caduta del potenziale di membrana, per saggiare la suscettibilità mitocondriale alla permeabilizzazione non specifica della membrana interna indotta dal  $\text{Ca}^{2+}$  (transizione di permeabilità). I nostri risultati mostrano che i mitocondri di ratti esposti a freddo caricati con  $\text{Ca}^{2+}$  subiscono un rigonfiamento maggiore che è efficacemente inibito da EGTA o ciclosporina A, e che , per tale motivo, può essere attribuito alla

formazione del poro di transizione di permeabilità (PTP). La formazione del poro potrebbe essere legata ad effetti diretti o indiretti degli ormoni tiroidei. Infatti l'apertura del poro potrebbe essere dovuta all'azione diretta della  $T_3$  in seguito al legame con un sito specifico del sistema di gating del PTP, o, all'azione di ROS, i livelli delle quali, come detto, aumentano negli stati ipertiroidei. Le ROS possono ossidare i gruppi tiolici, smascherati dalla presenza del  $Ca^{2+}$ , di proteine coinvolte nella formazione del PTP.

Se così, sia l'aumento dell'emissione luminosa riscontrato durante la valutazione della suscettibilità mitocondriale a condizioni di stress ossidativo diretto, sia l'aumento dello swelling mitocondriale indotto dal calcio, osservato nei preparati mitocondriali ottenuti da ratti esposti alle basse temperature, sarebbero una conseguenza dell'aumentata suscettibilità indotta dalla  $T_3$  di tali mitocondri agli insulti ossidativi.

La suscettibilità alla permeabilizzazione sembra avere importanti implicazioni per la regolazione della produzione cellulare di ROS.

Tutti i meccanismi mediante i quali l' $O_2^-$ , e i suoi prodotti, sono rimossi, sono appena sufficienti nel proteggere le cellule dagli effetti dannosi dell'aerobiosi, perché essi inattivano le ROS già prodotte, ma non bloccano la loro formazione.

Tra i meccanismi specializzati nella prevenzione sulla formazione delle ROS è stata proposta la mitoptosi mediata da PTP, indotta da ROS. Secondo tale ipotesi i mitocondri che hanno un'elevata produzione di ROS mantengono i PTP aperti e sono eliminati dalla cellula, mentre gli organelli che producono ROS con bassa velocità sopravvivono.

Per verificare questa ipotesi abbiamo studiato gli effetti del freddo su tre popolazioni mitocondriali, che sono state ottenute mediante centrifugazione differenziale (Venditti et al., 1996).

I risultati ottenuti indicano che modificazioni di tali caratteristiche rappresentano una risposta adeguata della popolazione mitocondriale epatica alla condizione di stress indotta dall'esposizione alle basse temperature.

Nonostante, come detto, nel tessuto epatico si osservi un aumento del consumo di  $O_2$  nei ratti esposti a freddo (Stoner et al., 1973; Guernsey et al., 1977), esso non è associato a un corrispondente aumento nella respirazione mitocondriale (Venditti et al., 2004; Iossa et al., 1991 a,b). Tali risultati concordano pienamente con quanto si evidenzia nelle frazioni. Infatti, in seguito all'esposizione alle basse temperature, durante la fase 4 della respirazione si assiste ad un aumento del consumo di  $O_2$  solo nella frazione  $M_{10}$ , mentre durante la fase 3 tale aumento si riscontra solo nella frazione  $M_1$ .

E' stato osservato che il contenuto percentuale della frazione  $M_1$ , quella con la più alta capacità ossidativa, diminuisce in seguito all'esposizione a freddo, il che può sembrare in netta contraddizione con l'osservazione che le capacità ossidative, sia dell'intera popolazione mitocondriale che del tessuto, aumentano. In realtà, la più alta capacità ossidativa osservata nei mitocondri, è dovuta all'aumento, indotto dal freddo, delle capacità ossidative di tutte le frazioni isolate, mentre quella riscontrata nel tessuto epatico è da attribuire all'aumento del contenuto di proteine mitocondriali. In definitiva, l'aumento della capacità metabolica

del fegato sembra dovuto principalmente ad una proliferazione dei mitocondri che, malgrado l'aumentata capacità ossidativa osservata, non mostrano poi un più alto consumo di  $O_2$  durante la respirazione.

Tale proliferazione mitocondriale compensa la riduzione del contenuto percentuale della frazione mitocondriale  $M_1$ , caratterizzata, come detto, da una elevata attività respiratoria. In effetti, l'aumento dell'attività metabolica del fegato potrebbe essere ottenuto più facilmente ricorrendo ad un aumento quantitativo della frazione pesante  $M_1$ , senza attuare processi così dispendiosi per gli epatociti, quali l'aumento della velocità di sintesi delle proteine mitocondriali ed il turnover della frazione metabolicamente più attiva. È quindi da ritenere che tale risposta del fegato all'esposizione alle basse temperature offra altri tipi di vantaggi caratterizzati da un più alto valore adattativo.

Nei mitocondri l' $H_2O_2$  deriva dalla dismutazione spontanea del radicale superossido ( $O_2^-$ ), generato dalla riduzione univalente dell' $O_2$  mediata da carriers elettronici siti in prossimità del centro Fe-S del complesso I (Turrens e Boveris, 1980) o del segmento compreso tra NADH-deidrogenasi ed ubiquinone/citocromo b del complesso III (Loschen, Flohè e Chance, 1971). Sia il presente lavoro che studi già effettuati in passato mostrano che i mitocondri della frazione  $M_1$  rilasciano l' $H_2O_2$  alla velocità più elevata e, perciò, nei ratti di controllo, essi forniscono il principale contributo al danno ossidativo degli epatociti. Poiché, l'esposizione a freddo produce incrementi nelle velocità di rilascio di  $H_2O_2$  che rimane elevata nella frazione  $M_1$ , la riduzione nella quantità relativa di tale frazione, limita il danno epatico nei ratti esposti a freddo.

I meccanismi alla base dei cambiamenti indotti dall'esposizione a freddo sulla velocità di rilascio dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  delle frazioni mitocondriali  $\text{M}_1$  e  $\text{M}_3$  sembra siano diversi da quelli che operano nella frazione  $\text{M}_{10}$ . Poiché l'esposizione a freddo non modifica la capacità di rimozione dell' $\text{H}_2\text{O}_2$  delle frazioni mitocondriali, l'aumento del rilascio di  $\text{H}_2\text{O}_2$  indotto dal freddo riflette senza dubbio un'aumentata produzione del perossido. Nei mitocondri integri, la quantità di  $\text{H}_2\text{O}_2$  prodotta è correlata alla concentrazione dei carriers elettronici nella forma ridotta (Boveris et al., 1973).

L'esposizione a freddo, determina un aumento dell'attività della COX e del contenuto del CoQ in tutte le frazioni mitocondriali, tuttavia è stato riportato che esso produce anche cambiamenti diversi e temporalmente oscillanti dei livelli dei citocromi  $\text{aa}_3$ ,  $\text{c}+\text{c}_1$  e b dei mitocondri epatici (Bravo et al., 2001). Per tale motivo non è possibile ritenere che il freddo aumenti il contenuto di altri componenti della catena respiratoria, compresi i carriers elettronici auto-ossidabili. D' altra parte eventuali diminuzioni indotte dal freddo del contenuto relativo di alcuni carriers elettronici, farebbero ridurre il flusso elettronico attraverso la catena respiratoria, questo spiegherebbe l'assenza di variazioni nel consumo di  $\text{O}_2$  da parte delle frazioni  $\text{M}_1$  e  $\text{M}_3$ , le quali presentano, invece, una elevata attività del complesso IV (COX). Inoltre, il ridotto flusso elettronico potrebbe indurre un aumento del grado di riduzione dei trasportatori elettronici auto-ossidabili nonostante l'aumento della loro concentrazione.

L'analisi delle caratteristiche che influenzano la suscettibilità al danno ossidativo delle frazioni mitocondriali ci permette di proporre un

meccanismo per spiegare la riduzione, indotta dal freddo, del contenuto percentuale della frazione mitocondriale pesante  $M_1$ . Come già accennato i mitocondri sono i principali siti generatori di ROS ma il loro bersaglio primario,cosicché variazioni nella produzione di ROS a livello mitocondriale. In accordo con ciò, nei ratti esposti a freddo il danno ossidativo ai lipidi e alle proteine mitocondriali aumenta, rimanendo più elevato nella frazione  $M_1$ , che infatti mostra una più alta velocità di produzione di  $H_2O_2$  rispetto alle altre frazioni. Tale aumento non è però associato ad una diminuzione dei livelli degli scavengers a basso peso molecolare. Anche per le frazioni mitocondriali, infatti, sono stati determinati gli effetti del freddo sulle concentrazioni di antiossidanti quali vitamina E (VE), coenzima Q (CoQ) e GSH.

I risultati ottenuti mostrano che l'esposizione al freddo determina un aumento degli antiossidanti liposolubili nelle frazioni mitocondriali. Viceversa, il GSH subisce una transitoria riduzione, indice di una solo iniziale incapacità del sistema di trasporto per il GSH, localizzato nel mitocondrio, di compensare il suo consumo. Comunque, anche in questo caso, le variazioni dei livelli di singoli antiossidanti forniscono solo una informazione limitata per quel che concerne lo stato antiossidante globale delle frazioni mitocondriali.

E' da tener presente, inoltre, che vi sono tante altre cause responsabili della suscettibilità dei mitocondri agli ossidanti e dell'entità del danno ossidativo prodotto. I livelli dei PUFA nei fosfolipidi di membrana, per esempio, influenzano molto l'entità del danno ossidativo lipidico, a causa dell'elevata presenza in essi di idrogeni debolmente legati,

prontamente rimossi dalle ROS, in grado di innescare le reazioni a catena che portano poi alla perossidazione lipidica. Anche il contenuto mitocondriale di emoproteine o altri ligandi del ferro influenza fortemente la suscettibilità al danno ossidativo, indotta dalle ROS, dei lipidi di membrana (Halliwell, Gutteridge, 1990) attraverso la conversione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\cdot\text{OH}$  via reazione di Fenton. Lo stesso radicale è ovviamente responsabile anche delle modificazioni ossidative a carico delle proteine (Halliwell, Gutteridge, 1984). È interessante notare che le caratteristiche delle frazioni mitocondriali, non determinano solo l'estensione del danno ossidativo, ma anche la suscettibilità a condizioni di stress.

I nostri risultati mostrano che la suscettibilità allo stress ossidativo delle frazioni mitocondriali di fegato di ratti  $\text{CE}_2$  e  $\text{CE}_{10}$  è più elevata rispetto a quella degli animali di controllo. L'incremento della suscettibilità agli ossidanti indotta dal freddo è dovuta essenzialmente all'aumento di sostanze, come le emoproteine, in grado di reagire con  $\text{H}_2\text{O}_2$  producendo il radicale ossidrilico altamente reattivo. Tale incremento è particolarmente rilevante nella frazione  $\text{M}_{10}$ . Questo suggerisce che, in seguito all'esposizione al freddo, la frazione  $\text{M}_{10}$  contiene una più elevata quantità di mitocondri danneggiati, derivanti dalla degradazione della frazione  $\text{M}_1$ . Tale tesi è sostenuta dall'aumento dell'attività della COX e del contenuto di antiossidanti liposolubili della frazione  $\text{M}_{10}$ . Ulteriori conferme giungono dai risultati ottenuti sottoponendo le preparazioni mitocondriali a un carico di  $\text{Ca}^{2+}$  in vitro.

Come già detto, in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$ , le modificazioni ossidative di proteine tioliche della membrana mitocondriale interna provocano lo

swelling mitocondriale e la caduta del potenziale di membrana. (Vercesi *et al.*;1997). In tutti i gruppi, i mitocondri delle frazioni M<sub>1</sub> e M<sub>10</sub> caricati con Ca<sup>2+</sup> mostrano rispettivamente lo swelling più alto e più basso. Inoltre, il valore di assorbimento della frazione M<sub>10</sub>, prima dell'aggiunta di Ca<sup>2+</sup>, è il 58.7% del valore della frazione M<sub>1</sub> nei ratti di controllo e diventa il 41.2% nei ratti CE<sub>10</sub>. Questo suggerisce che, oltre ai mitocondri leggeri dotati di bassa suscettibilità alla permeabilizzazione, la frazione M<sub>10</sub> contiene mitocondri danneggiati provenienti dalla frazione M<sub>1</sub> dotati di un alto grado di swelling e di un basso valore del potenziale di membrana; e la quantità di tali mitocondri nella frazione leggera cresce in seguito all'esposizione alle basse temperature. I risultati riportati, in definitiva, sostengono l'ipotesi che le caratteristiche dei mitocondri M<sub>1</sub> (alta capacità di produrre ROS e alta suscettibilità agli ossidanti) non solo determinano l'estensione del danno ossidativo, ma li rendono anche più suscettibili alle modificazioni che conducono alla loro degradazione.

E' da tener presente, comunque, che i mitocondri sono dotati di meccanismi intrinseci capaci di contrastare il danno ossidativo, impedendo una sua propagazione. Infatti, se l'azione degli antiossidanti è insufficiente, i mitocondri attivano un processo noto come mitoptosi mitocondriale, mediato dal poro di transizione di permeabilità (PTP) ed indotto dalle ROS. Poiché la matrice mitocondriale costituisce un compartimento osmoticamente isolato, la formazione del PTP, che è un poro non selettivo, induce l'ingresso di acqua nella matrice ed il rigonfiamento mitocondriale. Come risultato, la membrana esterna si rompe giacché la sua area è più piccola di quella della membrana interna



(Skulacev, 1996). La perdita dell'integrità della membrana mitocondriale esterna è il primo passo verso la loro degradazione ed eliminazione. Tale processo potrebbe servire a purificare il tessuto epatico da mitocondri che producono una elevata quantità di ROS limitando il danno ossidativo epatico in animali esposti alle basse temperature ambientali.

In conclusione, i mitocondri rappresentano, già in condizioni normali, la principale sorgente di specie parzialmente ridotte dell'ossigeno responsabili del danno ossidativo alle molecole biologiche e quindi dell'invecchiamento cellulare. Durante l'esposizione alle basse temperature, l'aumento delle capacità metaboliche, dovuto ad un aumento dei componenti della catena respiratoria, mediato dagli ormoni tiroidei, produce un incremento dei livelli di ROS, che si traduce in un incremento del danno ossidativo a diverse macromolecole cellulari, testimoniato dall'aumento degli indicatori del danno ossidativo.

Tra i mitocondri tuttavia, quelli funzionalmente più efficienti sono anche i principali produttori di ROS, ma anche i più proni all'insulto ossidativo, e che, per tale motivo, possono essere eliminati dalla cellula maggiore probabilità.

Così i nostri risultati suggeriscono che, l'induzione da parte degli ormoni tiroidei dei componenti della catena respiratoria, che si registra in seguito all'esposizione al freddo, gioca un ruolo fondamentale nell'acclimatazione alle basse temperature, ma è pagata al prezzo di un aumento, a livello tissutale e mitocondriale, della suscettibilità ad una possibile sfida ossidativa. Nonostante ciò nel tessuto è operativo un

sistema a feed back negativo che limita l'eccessivo danno tissutale eliminando i mitocondri più pericolosi mediante mitoptosi.

# Bibliografia

Asayama K, Dobashi K, Hayashibe H, Megata Y, Kato K (1987) Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology* **121**: 2112-2118

Åckerman K.E.O.; Wilkström M.K.F. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **68**: 191-197

Barrè H, Bailly L, Rouanet JL (1987) Increased oxidative capacity in skeletal muscle from acclimated ducklings: A comparison with rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**: 519-522

Bravo C.Vargas-Suarez M., Rodriguez-Enriquez s., Loza-Tavera H., Moreno-Sanchez R. (2001) Metabolic changes induced by cold stress in rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 289-301

Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muezzin P, Giacobino JP (1997) *FEBS Lett.* **408**, 39-41

Boveris A.; Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **134**: 707-716

Cannon B, Nedergaard J (1985) The biochemistry of an inefficient tissue : brown adipose tissue. *Essays in Biochemistry* **20**, 110-164

Castilho R. F., Brown adipose tissue thermogenesis in obese animals. *Nutr Rev* **41**, 261-267

Castilho R.F.; Kowaltowski, A.J.; Vercesi, A.E. (1998) 3,5,3'-triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 151-157

Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**: 527-605,

De Martino Rosaroll P, Venditti P, Di Meo S, De Leo T (1996) Effect of cold exposure on electrophysiological properties of rat heart. *Experientia* **52**, 577-582

Di Meo S, Venditti P, De Leo T. (1996) Tissue protection against oxidative stress. *Experientia* **52**: 786-794

Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand, K. (1992) The action of lipid-soluble antioxidant in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitor of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **548**: 41-46

Fernández, V, Llesuy S, Solari L, Kipreos K, Videla LA, Boveris A (1988) Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Radic Res Commun* **5** 77-84

Fernández, V, Videla LA, Thyroid hormone, active oxygen, and lipid peroxidation. In: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine* pp 105-115, Eds J Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, Boca Raton FL, CRC Press Inc.

Fernández V, Videla LA, (1993) Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. *Free Radic. Res. Commun.* **18**: 329-335

Fleury C, Neverova M, Collins S, Reimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwitt RS, Ricquier D, Warden CH (1997) *Nature Genet* **15**, 269-272

Foster DO, Frydman ML (1979) Tissue distribution of cold induced thermogenesis in conscious warm or cold acclimated rats revaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by non-shivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmac* **57**, 257-270

Gear A.R.L. (1965) Some features of mitochondria and fluffy layer regenerating rat liver. *Biochem. J.* **95**: 118-137

Girardier L (1983) Brown fat: an energy dissipating tissue. In *Mammalian Thermogenesis* pp. 51-97, Chapman and Hall, London

Gornall A.G. et al., (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751-766

Griffith H.R. et al., (1988) *Free radic. Chem., Pathol. & Med.*, 439-454.

Griffith O.W. (1980) Determination of glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212

Goglia F, Liverini G, De Leo T, Barletta A (1983) Thyroid state and mitochondrial population during cold exposure. *Pflugers Arch* **396**, 49-53

Guernsey DL, Stevens ED (1977) The cell membrane sodium pump as a mechanism for increasing thermogenesis during cold acclimation in rats. *Science* **186**, 908-910

Gutteridge J.M.C. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem. Vol. 41, No* **12**: 1819-1828,

Gutteridge J.M.C. (1987) Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochem J* **243**: 709-714

Halliwell B.; Gutteridge J.M.C. (1998) *Free radicals in biology and medicine* 3<sup>rd</sup>. ed. Oxford University press, Oxford

Halliwell B.; Gutteridge J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85

Heat R.L., Tappel AL (1976) A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxide. *Anal. Biochem.* **76**: 184-191

Himms-Hagen J (1983) Brown adipose tissue thermogenesis in obese animals. *Nutr Rev* **41**, 261-267

Hyslop P.A.; Sklar L.A. (1984) A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal. Biochem.* **141**: 280-286

Horrum M.A., Tobin RB, Ecklund R (1985) Thyroxine-induced changes in rat liver mitochondrial cytochromes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **41**: 163-169

Iossa S. et al., (1991) Effect of thyroid state and cold exposure on rat liver mitochondrial protein mass and function. *J. Endocrinol.* **131**: 67-73

Jansky L (1963) Body organ thermogenesis of the rat during exposure to cold and at maximal metabolic rate. *Fed Proc* **25**, 1297-1302

Kagan VE, Sebrinova EA, Packer L (1990) Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**: 851-857

Kehrer J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* **23**: 21-48

Lanni A. et al., (1996) Biochemical and functional differences in rat liver mitochondrial subpopulations obtained at different gravitational forces. *Int J Biochem Cell Biol* **28**: 337-343

Lang JK, Gohil K, Packer L (1986) Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **157**: 106-116

Loschen G.; Flohé L.; Chance B. (1971) Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.* **18**: 261-264

Liu Q, Bai C, Chen F, Wang R, Mac Donal T, Gu M, Zhang Q, Morsy MA, Caskey CT (1998) *Gene* **207**, 1-7

López-Torres M, Romero M, Barja G (2000) Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Mol. Cell. Endocrinol.* **25**: 127-134

Mano T, Sinohara R, Sawai Y, Oda N, Nishida Y, Mokuno T, Kotake M, Hamada M, Masunaga R, Nakai A, Nagasaka A (1995) Effects of thyroid hormone on coenzima Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. *J. Endocrinol.* **145**: 131-136

Mao W, Yu X-X, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G (1999) *FEBS Lett.* **443**, 326-330

Nejad IF, Bollinger JA, Mitnich M, Reichlin S (1972) Importance of T3 (triiodothyronine) secretion in altered states of thyroid function in the rat: cold exposure, subtotal thyroidectomy, and hypophysectomy. *Trans Assoc Ann Physicians* 85, 295

Neradilová M, Hrubá F, Novaková V, Bahosová I (1973) Investigations of the relationship between thyroid function and  $\alpha$ -tocopherol concentration of serum and in some organs of the rat. *Int J Vit Nutr Res* **43** 283-290

Nicholls DG, Locke RM (1984) Thermogenic mechanism in brown fat. *Physiological Reviews* **64**, 1-64

Nishiki K, Ericinska M, Wilson DF, Cooper S (1978) Evaluation of oxidative phosphorylation in hearts from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Am. J. Physiol.* **235**: C212-C219 1121-1131

**Reznick AZ, Packer L** (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzymol.* **233**: 357-363

Sanchis D, Fleury C, Chromiki N, Goubert M, Huang Q, Neverova M (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 34611-34615

Satav J.G. (1973) in *Proceedings Department of Atomic Energy Symposium on Control Mechanism in cellular Processes*. Bombay pp. 117-127

Schwartz H., Oppenheimer, J.H (1978) Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. *Pharmacol. Ther.* **3** :349-376

Schild L et al., (1997) Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation : involvement of oxidative protein modification. *Biochem J* **328**: 205-210

Sies H (1991) Oxidative stress :oxidants and antioxidants. London Academic Press.

Simon L.M. e Robin E.D. (1971) Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption. International Journal of Biochemistry **2**: 560-573

Skulacev V.P. (1996b) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanism to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. FEBS Lett. **397**: 7-10

Stadtman, E.R. (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. Trends Biochem. Sci. **11**: 11-12,.

Stoner H.B. (1973) The role of the liver in nonshivering thermogenesis in the rat. J. Physiol. **232**: 285-296

Swarrop A, Ramasarna T (1985) Heat exposure and hypothyroid conditions decrease hydrogen peroxide generation in liver mitochondria. Biochem. J. **226**: 403-408

Tapia G, Corneo P, Fernàndez V, Videla LA ( 1999) Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. Toxicol. Lett. **106**: 209-214

Tappel AL (1972) Vitamin and free radical peroxidation of lipids. Ann. N.Y. Acad. Sci. **203**: 12-28

Terblanche SE, Masondo TC, Nel W (2000) Effects of chronic cold exposure on the activities of cytochrome oxidase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in rat tissues (*Rattus Norvegicus*). Comp Biochem physiol B **127**, 319-324

Turrens J.F.; Boveris A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem. J. **191**: 421-427

Venditti P.; Di Meo S.; De Leo T. (1996) Effect of thyroid state on characteristics determining the susceptibility to oxidative stress of mitochondrial fractions from rat liver. Cell. Physiol. Biochem. **6**: 283-295

Venditti P.; Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T (1997) Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissue .Journal of endocrinology **155** ,151-157



Venditti P, Daniele MC, Masullo P, Di Meo S (1999) Antioxidant-sensitive triiodothyronine effects on characteristics of rat liver mitochondrial population. *Cell. Physiol. Biochem.* **9**: 38-52

Venditti P, De Leo T, Di Meo S (1999c) Determination of tissue susceptibility to oxidative stress by enhanced luminescence technique. *Methods Enzimol.* **300**: 245-252

Venditti P, et al., (2001) Hemoproteins affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removal from rat tissue. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **33**: 293-301

Venditti P, De Rosa R, Di Meo S. (2003) Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. *Free Radical Biol. Med.* **35** 485-494

Venditti P, De Rosa R, Di Meo S (2003a) Effect of thyroid state on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by rat liver mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*, **205**, 151-157

Venditti P, Puca A, Di Meo S (2003c) Effect of thyroid state on rate and sites of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in rat skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **411**, 121-128

Venditti P.; De Rosa R.; Portero-Otin M.; Pamplona R.; Di Meo S. (2004) Effect cold-induced hyperthyroidism on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and susceptibility to stress conditions of rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **36**:348-358

Vercesi A.E.; Kowaltowski A.J. et al., (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* **17**: 43-52

Vaidl-Puig A, Solanes G, Gzujie D, Flier JS, Lowell BB (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 79-82

Videla LA (2000) Energy metabolism, thyroid calorogenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. *Redox Report*, **5** , 265-275.

Winder WW, Holloszy JQ (1977) Response of mitochondria of different types of skeletal muscle to thyrotoxicosis *Am. J. Physiol.* 232 (1977) C180-C184.

Wolff S.P. *et al.*, (1986) Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzyme hydrolysis. *Biochem. J.* **234**: 399-403

Yu B.P. (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**: 139-162

# Indice

PREMESSA	<i>pag. 1</i>
INTRODUZIONE	<i>pag. 3</i>
Esposizione a freddo ormoni tiroidei	<i>pag. 4</i>
Mitocondri e Specie reattive dell'ossigeno	<i>pag. 10</i>
Danni ossidativi	<i>pag. 12</i>
Sistemi Antiossidanti	<i>pag. 14</i>
Stress ossidativo	<i>pag. 16</i>
Eterogeneità della popolazione mitocondriale	<i>pag. 19</i>
SCOPO della TESI	<i>pag. 23</i>
MATERIALI e METODI	<i>pag. 26</i>
Animali	<i>pag. 27</i>
Procedura sperimentale	<i>pag. 28</i>
Isolamento dei mitocondri	<i>pag. 29</i>
Preparazione frazioni mitocondriali	<i>pag. 29</i>
Dosaggio proteico	<i>pag. 30</i>
Attività citocromo ossidasi	<i>pag. 31</i>
Consumo di O <sub>2</sub>	<i>pag. 33</i>
Rilascio di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>pag. 34</i>
Capacità di rimozione di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>pag. 36</i>
Danno ossidativo ai lipidi	<i>pag. 38</i>
Danno ossidativo alle proteine	<i>pag. 40</i>
Determinazione dei livelli di anti-ossidanti	<i>pag. 43</i>
Suscettibilità allo stress ossidativo	<i>pag. 46</i>
Potenziale di membrana e swelling	<i>pag. 49</i>

Analisi Statistica	<i>pag.</i> 52
RISULTATI	<i>pag.</i> 53
DISCUSSIONE	<i>pag.</i> 84
BIBLIOGRAFIA	<i>pag.</i> 102
INDICE	<i>pag</i> 108